

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-245666

(P2001-245666A)

(43)公開日 平成13年9月11日 (2001.9.11)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト <sup>8</sup> (参考)
C 12 N 15/09	Z NA	A 01 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 01 H 5/00		A 01 K 67/027	2 G 0 4 5
A 01 K 67/027		A 61 K 39/395	D 4 B 0 2 4
A 61 K 39/395			N 4 B 0 6 3
		45/00	1 0 1 4 B 0 6 4
		審査請求 未請求 請求項の数35 OL (全126頁)	最終頁に統ぐ

(21)出願番号 特願2000-60548(P2000-60548)

(22)出願日 平成12年3月6日 (2000.3.6)

(71)出願人 000001029

協和醸酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 佐々木 克敏

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸  
酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 中谷 幸江

東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協  
和醸酵工業株式会社本社内

(72)発明者 佐伯 智

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸  
酵工業株式会社東京研究所内

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 新規ポリペプチド

(57)【要約】

【課題】 新規なG蛋白質共役型受容体ポリペプチドを取得し、該ポリペプチドに対するリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明によれば、ヒト胃癌細胞由来のcDNAライブラリーから選ばれるcDNAクローンをランダムにシーケンスし、新規G蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNAを取得できる。該DNAにコードされるポリペプチドまたはその部分ポリペプチドを用いて、該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索系またはスクリーニングキット、該探索系またはキットを用いて得られる化合物、該ポリペプチドに対する抗体を提供できる。また該DNAを用いて、該DNAが欠損した非ヒト哺乳動物を提供できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型受容体ポリペプチド。

【請求項2】 配列番号1に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ請求項1に記載のポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチド。

【請求項3】 請求項1または2に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドであり、かつ該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチド。

【請求項4】 請求項1または2に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNA。

【請求項5】 配列番号2に記載のDNA中において、塩基番号175～1287番で表される塩基配列を有するDNA。

【請求項6】 請求項4または5に記載のDNAから選ばれるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつ請求項1に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項7】 請求項3に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項8】 請求項6に記載のDNAにコードされるポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであり、かつ請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項9】 請求項4～8のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組込んで得られる組換えDNA。

【請求項10】 請求項9に記載の組換えDNAを保有する形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物。

【請求項11】 請求項10に記載の形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物を用い、(i)該形質転換細胞を培地中で培養し該培養物中に、(ii)該形質転換植物を栽培し該植物中に、または(iii)該形質転換非ヒト動物を飼育し該動物中に、請求項1または2に記載のポリペプチドまたは請求項3に記載の部分ペプチドを生成蓄積させ、該培養物、該植物または該動物から該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを採取することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドまたは請求項3に記載のペプチドの製造方法。

【請求項12】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3記載の部分ペプチドを認識する抗体。

【請求項13】 請求項12に記載の抗体を用いる請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドの免疫学的定量方法。

【請求項14】 請求項13に記載の定量方法を用いる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

【請求項15】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を測定することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

【請求項16】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の欠失、置換または付加を検出することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

【請求項17】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドと、被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項18】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項19】 (i) 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドと、リガンドとを接触させた場合と (ii) 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドと、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項20】 (i) 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドとを接触させた場合と (ii) 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項21】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能

修飾物質のスクリーニング用キット。

【請求項22】 請求項17～20に記載のスクリーニング方法、または請求項21に記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質、またはその薬理学的に許容される塩。

【請求項23】 請求項12に記載の抗体、請求項22に記載のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストおよび機能修飾物質から選ばれる物質、またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【請求項24】 (i) 請求項1または2に記載のポリペプチドを発現する細胞と、(ii) 請求項1または2に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項25】 発現量の変動を、請求項13に記載の方法、または請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を定量する方法で測定することを特徴とする、請求項24に記載のスクリーニング方法。

【請求項26】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含有する形質転換体と被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現量を変動させる化合物を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項27】 転写を制御する領域が、配列番号15の20202～25202番目の塩基配列で表わされるDNA中の連続する50～5000bpの塩基配列を有するDNAで規定される領域である、請求項26に記載のスクリーニング方法。

【請求項28】 請求項24～27のいずれか1項に記載のスクリーニング方法から選ばれる方法によって得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

【請求項29】 請求項28に記載の化合物またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【請求項30】 請求項4～6に記載のDNAおよび配列番号2に記載のDNAから選ばれるDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるDNA。

【請求項31】 請求項4～6および30に記載のDN

Aから選ばれるDNAを用い、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

【請求項32】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子の全部または一部が欠損または置換し、請求項1または2に記載のポリペプチドの発現量が変化した遺伝子欠失または置換非ヒト動物。

【請求項33】 請求項32に記載の動物に被験試料を接種、または該動物の臓器、組織あるいは細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬を選択することを特徴とする、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬のスクリーニング方法。

【請求項34】 請求項33に記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

【請求項35】 請求項34に記載の化合物またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト視床由来の新規G蛋白質共役型受容体ポリペプチド、該ポリペプチドの部分ペプチド、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの製造方法、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを用いた該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを含有する該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはスクリーニング用キットによって得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩、該ポリペプチドをコードする遺伝子を欠損または一部改変した動物とその利用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】G蛋白質共役型受容体（以下、GPCRと略すこともある）は、生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の受容体として機能することで、生理学的または病態学的に非常に重要な役割を担っている。GPCRは、光、味物質、匂い物質などの受容体としても機能している。GPCRの具体的なリガンドとしては、蛋白質、ペプチド、生体アミン、脂質メディエータ、光子、カルシウム、糖、核酸など多種多様のものが知られている。ヘテロ三量体（G<sub>α</sub>、G<sub>β</sub>、G<sub>γ</sub>）のG蛋白質（guanine nucle

eutide-binding protein) と共に、G蛋白質の活性化を通して細胞内にシグナルを伝達する。GPCRは7個の膜貫通領域を有することから、7回膜貫通型受容体とも呼ばれる。

【0003】GPCRは創薬ターゲットとして非常にすぐれており、これまでにGPCRの天然リガンド、アゴニストまたはアンタゴニストが薬となっている。現在上市されている薬の約60%はGPCRをターゲットにしたものである。GPCRは遺伝病の原因にもなっており、遺伝病の診断や治療においても重要なターゲットである〔Trends in Pharmacological Science, 18, 430 (1984)〕。

【0004】したがって、新規なGPCRを取得し、その機能解析を行うことは、その機能と密接に関連した医薬品開発を行う上で、非常に有用な手段を提供する。例えば、脳などの中枢神経系の器官においては、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによって、脳の生理的な機能が調節されているが、脳内には未知のホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質が存在すると考えられる。胃、腸、脾臓などの器官の生理機能も、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによって調節されていることが知られており、胃、腸、脾臓などの器官には未知のホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質が存在すると考えられる。脳、胃、腸、脾臓などの器官においては、上記のホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質に対応する受容体（例えばGPCR）が存在していることも知られているが、これらの器官には未知の受容体（例えばGPCR）も存在すると考えられる。既知GPCRについても、新たなサブタイプが存在する可能性もある。

【0005】脳、胃、腸、脾臓において発現している新規なGPCR遺伝子を取得できれば、該GPCRのアミノ酸配列と既知GPCRのアミノ酸配列とを比較したり、該GPCR遺伝子の転写物の発現分布を調べることにより、該GPCRの機能を推定し、医薬品開発に有用な情報を得ることができる。また、新規GPCR遺伝子が取得できれば、該GPCRに対する天然リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストを効率よくスクリーニングすることが可能になる。該天然リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストは医薬品として期待される。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】これまで知られていないG蛋白質共役型受容体ポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAが得られれば、該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニングが可能になり、該スクリーニングによって得られる物質は医薬品として有用である。

【0007】本発明は、ヒト視床由来の新規G蛋白質共

役型受容体ポリペプチドまたはその部分ペプチド、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの製造方法、該ポリペプチドに対するリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法およびスクリーニング用キット、該スクリーニング方法および該スクリーニングキットを用いて得られるリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質と該リガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を含有する医薬、および該ポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する抗体などを提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト胃癌細胞株 KATOIII由来のcDNAライブラリーの各cDNAクローンの配列をランダムにシークエンスすることにより、これまでに知られていなかった新規なGPCRの一部をコードするcDNAを単離することに成功した。該cDNAはC末端部分を欠失していたため、該新規GPCRポリペプチド全長をコードするcDNAをヒト視床より取得し、全塩基配列を決定・解析することにより、本発明を完成するに至った。

【0009】本発明は、以下の(1)～(35)に関する。

(1) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型受容体ポリペプチド。

(2) 配列番号1に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ(1)に記載のポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチド。

(3) (1)または(2)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドであり、かつ該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチド。

(4) (1)または(2)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNA。

(5) 配列番号2に記載のDNA中において、塩基番号175～1287番で表される塩基配列を有するDNA。

(6) (4)または(5)に記載のDNAから選ばれるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつ(1)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(7) (3)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNA。

(8) (6)に記載のDNAにコードされるポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであり、かつ

(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチドをコードするDNA。

(9) (4)～(8)のいずれか1つに記載のDNAをベクターに組込んで得られる組換え体DNA。

(10) (9)に記載の組換え体DNAを保有する形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物。

(11) (10)に記載の形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物を用い、(i)該形質転換細胞を培地中に培養し該培養物中に、(ii)該形質転換植物を栽培し該植物中に、または(iii)該形質転換非ヒト動物を飼育し該動物中に、(1)または(2)に記載のポリペプチドまたは(3)に記載の部分ペプチドを生成蓄積させ、該培養物、該植物または該動物から該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを採取することを特徴とする、(1)または(2)に記載のポリペプチドまたは(3)に記載のペプチドの製造方法。

(12) (1)または(2)に記載のポリペプチド、または(3)に記載の部分ペプチドを認識する抗体。

(13) (12)に記載の抗体を用いる(1)または(2)に記載のポリペプチド、または(3)に記載の部分ペプチドの免疫学的定量方法。

(14) (13)に記載の定量方法を用いる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

(15) (1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を測定することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

(16) (1)または(2)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の欠失、置換または付加を検出することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

(17) (1)または(2)に記載のポリペプチド、または(3)に記載の部分ペプチドと、被験試料とを接触させ、被験試料より(1)または(2)に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1)または(2)に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(18) (1)または(2)に記載のポリペプチド、または(3)に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より(1)または(2)に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1)または(2)に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(19) (i) (1)または(2)に記載のポリペプチド、または(3)に記載の部分ペプチドと、リガンドとを接触させた場合と(ii) (1)または(2)に記載

のポリペプチド、または(3)に記載の部分ペプチドと、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より(1)または(2)に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1)または(2)に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(20) (i) (1)または(2)に記載のポリペプチド、または(3)に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドとを接触させた場合と(ii) (1)または(2)に記載のポリペプチド、または(3)に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より(1)または(2)に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1)または(2)に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(21) (1)または(2)に記載のポリペプチド、または(3)に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、(1)または(2)に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キット。

(22) (17)～(20)に記載のスクリーニング方法、または(21)に記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、(1)または(2)に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質、またはその薬理学的に許容される塩。

(23) (12)に記載の抗体、(22)に記載のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストおよび機能修飾物質から選ばれる物質、またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

(24) (i) (1)または(2)に記載のポリペプチドを発現する細胞と、(ii) (1)または(2)に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より(1)または(2)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物を選択することを特徴とする、(1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(25) 発現量の変動を、(13)に記載の方法、または(1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を定量する方法で測定することを特徴とする、(24)に記載のスクリーニング方法。

(26) (1)または(2)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含有する形質転換体と被験試料とを接触させ、被験試料より(1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現

量を変動させる化合物を選択することを特徴とする、(1)または(2)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(27) 転写を制御する領域が、配列番号15の20202～25202番目の塩基配列で表わされるDNA中の連続する50～5000bpの塩基配列を有するDNAで規定される領域である、(26)に記載のスクリーニング方法。

(28) (24)～(27)のいずれか1つに記載のスクリーニング方法によって得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

(29) (28)に記載の化合物またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

(30) (4)～(6)に記載のDNAおよび配列番号2に記載のDNAから選ばれるDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるDNA。

(31) (4)～(6)および(30)に記載のDNAから選ばれるDNAを用い、(1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(32) (1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子の全部または一部が欠損または置換し、(1)または(2)に記載のポリペプチドの発現量が変化した遺伝子欠失または置換非ヒト動物。

(33) (32)に記載の動物に被験試料を接種、または該動物の臓器、組織あるいは細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬を選択することを特徴とする、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬のスクリーニング方法。

(34) (33)に記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

(35) (34)に記載の化合物またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】(1)本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドまたはその部分ペプチド  
本発明のポリペプチドは、G蛋白質共役型受容体ポリペプチドであり、例えば、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドのアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する

ポリペプチドと実質的に同一な活性を有するポリペプチドをあげることができる。

【0011】本発明のポリペプチドの由来は特に限定されるものではなく、その由来として例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞、あるいは該細胞の存在する組織をあげることができる。

【0012】該細胞の具体例としては、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、单球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞などをあげることができる。また該組織の具体例としては、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髓、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殼、尾状核、脳染、黒質)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓、胸腺、脾臓、頸下腺、末梢血、末梢血球、腸管、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、小腸、大腸、骨格筋などをあげることができる。特に、脳や脳の各部位は組織として好ましい。

【0013】また本発明のポリペプチドは、化学合成によって合成されたポリペプチドであってもよい。

【0014】上記の1個以上のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同一な活性を有するポリペプチドは、Molecular cloning, A laboratory manual, Second Edition. (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John and Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法により用いて、例えば配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数であり、1～数十個程度、好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個さらに好ましくは1～5個である。

【0015】また、該アミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドが配列番号1に記載のポリペプチドと実質的に同一な活性を有するには、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)、Nucleic acids Research, 25, 3389 (1997)]、FASTA [Method in Enzymology, 183, 63 (1990)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2444 (1988)]等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有することが好ましい。

【0016】上記の実質的に同一の活性としては、例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドの有するリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同一とは、それらの活性が性質的に同一であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用の程度、蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

【0017】本発明のポリペプチドとして、さらに上記ポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。また、上記ポリペプチドのC末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）のもの本発明のポリペプチドである。ここでエステル基のRとしては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC1-6アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC3-8シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのなどのC6-12アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C1-2アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C1-2アルキル基などのC7-14アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチルエステルなどであってもよい。本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記のC末端のエステルなどをあげることができる。

【0018】本発明のポリペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、

臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、succinic acid、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0019】本発明の部分ペプチドとは、本発明のポリペプチドの部分ペプチドであり、かつ本発明のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有するペプチドである。GPCRのリガンド結合領域は、細胞外領域、膜貫通領域、あるいは細胞外領域と膜貫通領域の両方であることが知られている（Current Opinion of Cell Biology, 6, 191 (1994)、EMBO J., 18, 1723 (1999)）。したがって、本発明のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する本発明の部分ペプチドとしては、例えば、該ポリペプチドを発現している細胞において、該細胞の膜の外に露出している部分（細胞外領域部分）、あるいは膜結合領域部分を含む部分ペプチドなどをあげることができる。また、本発明の部分ペプチドは、個々のドメインを個別に含むペプチドでも良いし、複数のドメインを同時に含む部分ペプチドでも良い。

【0020】任意のGPCRの膜結合領域は、既知のGPCRとのホモロジーを基に予測することができる（EMBO J., 12, 1693 (1993)）。したがって、該方法で予測した膜結合領域を基に、任意のGPCRの細胞外領域と細胞内領域を予測することができる。また、ハイドロバシー解析（アロカ社より購入した解析ソフトMacMolloy3.5を使用）や膜結合領域予測解析（三井情報開発より購入した解析ソフトSOSUI system ver1.0/10を使用）を行うことによっても、任意のGPCRの膜結合領域、細胞外領域、および細胞内領域を予測することができる。

【0021】したがって、本発明のポリペプチドに関して上記解析を行うことにより、具体的な細胞外領域（親水性部位）、膜結合領域（疎水性領域）、および細胞内領域（親水性領域）を予測することができる。

【0022】具体的には、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドにおいては、細胞外領域としては、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第1番目～第49番目、第107番目～第21番目、第187番目～第208番目または第298番目～第309番目のアミノ酸配列で表される領域をあげることができ、また、膜結合領域としては、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第50番目～第75番目、第81番目～第106番目、第122番目～第147番目、第161番目～第186番目、第209番目～第234番目、第272番目～第297番目または第310番目～第335番目のアミノ酸配列をで表される領域をあげることができる。

【0023】本発明の部分ペプチドとして、さらに上記

の部分ペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。また、上記部分ペプチドのC末端に存在するカルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）が、上記した本発明のポリペプチドと同様、アミドまたはエステル化されていてもよい。また、本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記のC末端のエステルなどがあげられる。本発明の部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などがあげられる。

（2）本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNA

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドをコードするDNAであればいかなるDNAでもよく、具体例として、（a）配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175～1287番で表される塩基配列を有するDNA、（b）（a）に記載のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNAなどをあげることができる。

【0024】上記のストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNAとは、上記（a）に記載のDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由來のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0 mol/LのNaCl存在下、42～65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrat

e) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L 塩化ナトリウム、15 mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、42～65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとしては、具体的にはBLAST、FASTA等の解析ソフトを用いて計算したときに、上記の（a）に記載のDNAと少なくとも60%以上の相同意を有するDNA、好ましくは80%以上の相同意を有するDNA、より好ましくは95%以上の相同意を有するDNAをあげることができる。

【0025】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、本発明の部分ペプチドをコードするDNAであればいかなるものであってもく、具体例として（a）配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175～1287番で表される塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有するDNAであり、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチドをコードするDNA、（b）本発明のポリペプチドをコードするDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズするDNAを表す塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有するDNAであり、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有するペプチドをコードするDNA、をあげることができる。

【0026】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとは、本発明のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する、本発明のポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであり、例えば、上記（1）に記載の方法で予測した細胞外領域または膜結合領域を含む部分ペプチドをコードするDNAをあげることができる。具体的には配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第1番目～第49番目、第107番目～第121番目、第187番目～第208番目または第298番目～第309番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAである、配列番号2で表わされる塩基配列の第175番目～第321番目、第493番目～第537番目、第733番目～第798番目または第1066番目～第1101番目の塩基配列を有するDNAをあげることができる。また、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第50番目～第75番目、第81番目～第106番目、第122番目～第147番目、第161番目～第186番目、第

209番目～第234番目、第272番目～第297番目または第310番目～第335番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAである、配列番号2で表される塩基配列の第322番目～第399番目、第415番目～第492番目、第538番目～第615番目、第655番目～第732番目、第799番目～第876番目、第988番目～第1065番目または第1102番目～第1179番目の塩基配列をあげることができる。また、本発明の部分ペプチドをコードするDNAは、個々の部分ペプチドを個別にコードするDNAであっても良いし、個々の部分ペプチドをコードするDNAを同時に複数含むDNAであっても良い。

【0027】(3) 本発明のポリペプチドをコードするDNAの取得、ならびに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、肺臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、織維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、单球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殼、尾状核、脳染（黒質）、脊髄、下垂体、胃、肺臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、腸管、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宫、骨、関節、小腸、大腸、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記の細胞や組織由来のcDNA、またはcDNAライブラリー等から選ばれる各々のゲノムDNAまたはcDNAをランダムにシーケンシングして得ることができる。

【0028】ゲノムDNAの調製、ゲノムDNAライブラリーの作製は、例えば上記各種細胞、器官または組織を用いて常法に従い行うことができる。具体的な方法としてはモレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載された方法をあげることができる。

【0029】cDNAおよびcDNAライブラリーの作製は、例えば、上記各種細胞、器官または組織由来のmRNAを用いて、常法により作製できる。具体的には、

モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、完全長cDNA作製法〔Methods in Enzymology, 303, 19 (1999)、Gene, 138, 171 (1994)〕、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング〔SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; Gibco BRL (Gibco BRL 社製) やザップ-cDNA・シンセシス・キット〔ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製〕を用いて作製できる。

【0030】ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBluescript II SK(+)〔Nucleic Acids Research, 17, 949 (1989)〕、λzap II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11〔DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)〕、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCE11 (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pCD2 (Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983))、pUC18 (Gene, 33, 103 (1985))、pAMo (J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)〕、pAMo-d (実施例1参照) 等をあげることができる。

【0031】ライブラリーの作製に用いる宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-BlueMRF' (ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992))、Escherichia coli C600 (Genetics, 39, 440 (1954))、Escherichia coli Y1088 (Science, 222, 778 (1983))、Escherichia coli Y1090 (Science, 222, 778 (1983))、Escherichia coli NM522 (J. Mol. Biol., 166, 1 (1983))、Escherichia coli K802 (J. Mol. Biol., 16, 118 (1966))、Escherichia coli JM105 (Gene, 38, 275 (1985))、Escherichia coli SOLR™ Strain (ストラタジーン社より市販) およびE. coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版) 等を用いることができる。

【0032】より具体的なcDNAライブラリーの作製方法としては以下の方法があげられる。

【0033】ヒト胃癌細胞KATOIIIから、モレキュラー・クローニング第2版記載の方法に準じてmRNAを抽出し、オリゴキャップ法〔Gene, 138, 171 (1994)〕によりcDNAを合成する。次に、蛋白質核酸酵素、41, 197 (1996)、Gene, 138, 171 (1994)記載の方法により第一鎖cDNAを合成した後、該cDNAの5'末端

側と3'末端側に設計したプライマーを用いてpolymerase chain reaction〔モレキュラー・クローニング第2版およびPCR Protocols Academic Press(1990)、以下PCRと略す〕により2本鎖cDNAに変換する。該cDNAは制限酵素SfiIで切断し、DraIで切断したクローニングベクター pME18SFL3(GenBank AB009864, Expression vector, 3392bp)に連結することで、cDNAライブラリーを作製できる。

【0034】cDNAの塩基配列は、cDNAライブラリーを構成する各大腸菌クローンをランダムに選び、該クローンよりプラスミドDNAを調製し、該プラスミドに含有されるcDNAの両末端側の塩基配列を、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕あるいは373A・DNAシークエンサー(Perkin Elmer社製)等の塩基配列分析装置を用いて決定することができる。

【0035】このようにして得られた塩基配列と相同性のある遺伝子、あるいは該塩基配列がコードするアミノ酸配列と相同性を有する蛋白質の存在をデータベース検索により調べる。検索には、Blast、FrameSearch法(Cmpugen社製)等のプログラムを利用することができる。データベースとしては、GenBank等の公的なデータベースを利用することもできるし、私的なデータベースも利用できる。該検索により、塩基レベルまたはアミノ酸レベルで既知のGPCRと相同性を示したcDNAに関しては、全塩基配列を決定し、該cDNAにコードされるポリペプチドの全アミノ酸配列を明らかにする。

【0036】該cDNAが完全長のポリペプチドをコードしていない場合は、以下のようにして完全長のポリペプチドをコードするcDNAを得ることができる。

【0037】各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNAライブラリーまたは上記記載の方法で作製できるcDNAライブラリーを錆型にして、該cDNAに特異的なプライマーセットを用いてPCRを行うことにより、該cDNAに対応する遺伝子を発現する臓器や細胞を特定し、特定された臓器あるいは細胞由来のcDNAライブラリーに対し、該cDNAをプローブにしてコロニーハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)を行うことにより新たに該cDNAの全長を含むcDNAをcDNAライブラリーから選択することができる。

【0038】また、該cDNAに対応する遺伝子が発現している臓器または細胞由来の一本鎖cDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーを錆型として、5' RACE法と3' RACE法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)〕を行うことにより、該cDNAの5'末端側の断片と3'末端側の断片を取得し、両断片を連結することにより、全長cDNAを取得することもできる。また、市販のキット(例えばベーリングー社製の5'/3' RA

CE kit)を用いて、5' RACE法と3' RACE法を行うことができる。

【0039】各種臓器または各種細胞由来の一本鎖cDNAライブラリーは、常法または市販されているキットに従って作製することができるが、例えば以下に示すような方法で作製できる。

【0040】各種臓器または各種細胞からグアニジウムチオシアネート・フェノールクロロホルム法〔Anal. Biochem., 162, 156 (1987)〕により全RNAを抽出する。必要に応じて、全RNAをデオキシリボヌクレアーゼI(Life Technologies社製)で処理し、混入の可能性がある染色体DNAを分解する。得られた全RNA各々について、オリゴ(dT)プライマーまたはランダムプライマーを用いてSUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA System(Life Technologies社)により一本鎖cDNAライブラリーを作製できる。上記のようにして作製した一本鎖cDNAライブラリーとしては、例えばヒト視床から作製した一本鎖cDNAライブラリーをあげることができる。

【0041】上記のようにして取得した完全長のポリペプチドをコードするcDNAの全塩基配列を決定し、該ポリペプチドのアミノ酸配列について、再度上記と同様にしてデータベース検索を行い、既知のGPCRとの相同性を調べることができる。また、該ポリペプチドのアミノ酸配列を用いて疎水性プロット解析を行い、該ポリペプチドがGPCRに共通する7回膜貫通領域を有するかを調べ、該ポリペプチドが7回膜貫通領域を有し、かつ既知のGPCRと相同性を示せば、該ポリペプチドはGPCRであると考えることができる。該ポリペプチドが既知GPCRとは異なる場合、該ポリペプチドは新規GPCRであると考えることができる。

【0042】また、決定された新規ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、該ポリペプチドをコードするDNAを化学合成することによっても目的のDNAを調製することができる。DNAを化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機 model 1392等を用いて行うことができる。

【0043】後述のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これらDNAに相補的なmRNAを発現している細胞のmRNAから調製したcDNAを錆型として、PCRを行うことによっても、目的とするDNAを調製することができる。

【0044】上記の方法により取得される新規G蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNAとして、例えば、配列番号1で表されるポリペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175~1287

番で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175~1287番で表される塩基配列を有するDNAがコードするポリペプチドは、ハイドロバシー解析、膜結合領域予測解析方法、およびENBO J., 12, 1693(1993)記載の方法により、以下の構造からなると予想される(図1、および図2~10参照)。N末端の細胞外領域(49アミノ酸)、第一膜貫通領域(26アミノ酸)、第一細胞内ループ(5アミノ酸)、第二膜貫通領域(26アミノ酸)、第一細胞外ループ(15アミノ酸)、第三膜貫通領域(26アミノ酸)、第二細胞内ループ(13アミノ酸)、第四膜貫通領域(26アミノ酸)、第二細胞外ループ(22アミノ酸)、第五膜貫通領域(26アミノ酸)、第三細胞内ループ(37アミノ酸)、第六膜貫通領域(26アミノ酸)、第三細胞外ループ(12アミノ酸)、第七膜貫通領域(26アミノ酸)、C末端の細胞内領域(36アミノ酸)。

【0045】アミノ酸配列のハイドロバシー解析により、該ポリペプチドはシグナルペプチドを有していないと考えられる(図1参照)。

【0046】配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pBS-KAT006734Lをあげることができる。pBS-KAT006734Lを保有する大腸菌Escherichia coli DH5 $\alpha$ /pBS-KAT006734LはFERM B P-6967として平成11年12月8日付けて工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)に寄託されている。

【0047】上記の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法により、あるいは該DNAの塩基配列情報を用いてDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0048】該オリゴヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列中の連続した5~60塩基と同じ塩基配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2に記載のDNAの塩基配列中の連続した5~60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(Tm)および塩基数が極端に変わらないオリゴヌクレオチドを選択することが好ましい。具体的には、例えば配列番号11および配列番号12で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのプライマーセット、配列番号11および配列番号17で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのプライマーセッ

ト、または配列番号13および配列番号14で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのプライマーセットをあげることができる。

【0049】更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体(以下、オリゴヌクレオチド誘導体という)も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5'プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5'チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5'プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxyazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる[細胞工学, 16, 1463(1997)]。

#### (4) 本発明のポリペプチドおよび部分ペプチドの製造法

本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を用いても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、例えばヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより単離・精製することができる。

【0050】本発明の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って合成することもできるし、あるいは本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目

的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(a)～(e)に記載された方法が挙げられる。

(a) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(b) Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(d) 矢島治明 および 植原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(e) 矢島治明監修、統医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0051】また上記方法以外にも上記(3)で得られた本発明のDNAを宿主細胞中で発現させることにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。

【0052】即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えDNAを造成し、該組換えDNAを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。

【0053】宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることもできる。

【0054】発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のDNAの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものを用いることができる。

【0055】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のDNAの発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規受容体遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0056】発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pSE280 (インビト

ロジエン社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK (-) (STRATAGENE社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen社)、pMAL-c2 (New England Biolabs社) 等をあげることができる。

【0057】プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P<sub>trp</sub>)、lacプロモーター (P<sub>lac</sub>)、P<sub>L</sub>プロモーター、P<sub>R</sub>プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、p<sub>en</sub>Pプロモーター等をあげることができる。またP<sub>trp</sub>を2つ直列させたプロモーター (P<sub>trp</sub> x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0058】リボソーム結合配列としては、シャインダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

【0059】本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

【0060】宿主細胞としては、エシエリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli BL21(DE3)、Escherichia coli BL21(DE3)pLysS、Escherichia coli HMS174(DE3)、Escherichia coli HMS174(DE3)pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Corynebacterium ammoniagenes、Brevibacterium

immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【0061】組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)〕、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【0062】酵母菌株を宿主細胞として用いる場合は、発現ベクターとして、例えば、YE p 13 (ATCC37115)、YE p 24 (ATCC37051)、YCP 50 (ATCC37419)、p HS 19、p HS 15等を例示することができる。プロモーターとしては、酵母菌株で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【0063】宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイペロミセス属、トリコスボロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる、またPCRの発現に適した変異株を用いることもできる〔Trends in Biotechnology, 15, 487 (1997)、Mol. Cell. Biol., 15, 6188 (1995)、Mol. Cell. Biol., 16, 4700 (1996)〕。

【0064】組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

【0065】動物細胞を宿主細胞として用いる場合は、発現ベクターとして、例えば、p c DNA I / Am p、p c DNA I、p CDM 8、p AGE 107、p RE P 4、p AGE 103、p AMo、p AMo A、p AMo-d(実施例1参照)、p AS 3-3等を例示する

ことができる。

【0066】プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediateearly)遺伝子のプロモーター、SV 40の初期プロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイルス(Moloney Murine Leukemia Virus)のロング・タミナル・リピート・プロモーター(Long Terminal Repeat at Promoter)、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRαプロモーター、あるいはメタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0067】宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ヒト大腸癌細胞株、カエルの卵母細胞およびカエルのメラニン細胞等をあげることができる。

【0068】さらにマウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NSO等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293等、ヒト白血病細胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等をあげることができる。

【0069】組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

【0070】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリ・マニュアル〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、モレキュラー・バイオロジー・ア・ラボラトリ・マニュアル〔Molecular Biology, A Laboratory Manual〕、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0071】即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させること

ができる。

【0072】該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacII I (すべてインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

【0073】バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・スクレア・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

【0074】昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞としては Sf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリ・マニュアル) 等、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞としては High 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては *Bombyx mori* N4 等をあげることができる。

【0075】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0076】また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0077】植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法 [組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じてポリペプチドを生産することができる。

【0078】遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン 1 等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

【0079】宿主細胞としては、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。

【0080】組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いるこ

とができる、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977)、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)、特開昭60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

【0081】遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーメンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

【0082】動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

【0083】プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである  $\alpha$  カゼインプロモーター、 $\beta$  カゼインプロモーター、 $\beta$  ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0084】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0085】形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成・蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0086】即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドまたは部分ペプチドを採取することにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、各種細胞の細胞膜画分、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

【0087】植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドまたは部分ペプチドを採取することによ

り、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。

【0088】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0089】炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

【0090】窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーリカーラー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いることができる。

【0091】無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

【0092】培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0093】また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0094】プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac*プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、*trp*プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

【0095】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されている RPMI 1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、D MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Soc-

iety for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0096】培養は、通常 pH 6～8、30～40℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で1～7日間行う。

【0097】また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0098】昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen社製)、SF-900 II SFM 培地 (ギブコ BRL社製)、ExCell 11400、ExCell 11405 (JRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788 (1962)) 等を用いることができる。

【0099】培養条件は pH 6～7、培養温度は 25～30℃、培養時間は通常 1～5 日間が好ましい。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0100】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、β-ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAの IgG 結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ (Arg)、ポリ (Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac 抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる [山川彰夫、実験医学, 13, 469-474 (1995)]。

【0101】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

【0102】宿主細胞外へ分泌発現させる場合、あるいは宿主細胞膜上に発現させる場合は、必要に応じて宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの N 端末側に付加する。該ポリペプチドまたは部分ペプチドの N 末端を一部欠失させた上で、上記分泌シグナルを付加した方がよい場合もある。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフィオスファーゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクターα・シグナル

配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

【0103】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドに、精製または検出用のタグを付加して発現することができる。タグは任意の場所に付加することができるが、哺乳動物細胞で発現させる場合、上述した細胞外領域または細胞内領域に付加するのが好ましい。

【0104】精製・検出用のタグとしては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスクレラーーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫、実験医学、13, 469-474 (1995)〕。

【0105】また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子增幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0106】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常のポリペプチドの単離・精製法を用いることができる。

【0107】例えば、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドが本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド製造用の形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

【0108】該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫安等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75(三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

【0109】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドが本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用の形質転換体の細胞膜上に蓄積する場合には、同様に細胞

を回収後破碎し、遠心分離やろ過により膜画分を得たのち、トリトンX-100などの界面活性剤を用いて該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを膜から可溶化した後、上記と同様の単離・精製法により精製標品を得ることができる。

【0110】また、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドまたは該ペプチドを回収後、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの不溶体を変性剤で可溶化する。該可溶化液を、変性剤を含まないあるいは変性剤の濃度がポリペプチドまたは該部分ペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離・精製法により精製標品を得ることができる。

【0111】細胞外に該ポリペプチドまたは該部分ペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離・精製法と同様の手法により、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの精製標品を得ることができる。

【0112】また、本発明のポリペプチドまたは該部分ペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる〔山川彰夫、実験医学、13, 469-474 (1995)〕。例えば、ロウラの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、W094/23201に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。

【0113】更に、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【0114】また、公知の方法〔J. Biomolecular NMR, 6, 129、Science, 242, 1162 (1988)、J. Biochem., 110, 166 (1991)〕に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを生産することもできる。

【0115】更に、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(タブチルオキシカルボニル

法) 等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech 社、パーキン・エルマー社、ファルマシアバイオテク社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0116】精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析(平野久著、東京化学同人発行、1993年)に記載の方法により実施可能である。

【0117】上記の方法で得られる本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを、適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

【0118】上記方法で製造できる本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド、若しくはそれらの塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

#### (5) 本発明のポリペプチドを認識する抗体

(5-1) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の生産  
(1) ポリクローナル抗体の作製

上記(4)に記載の方法により取得したポリペプチドまたは部分ペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。【0119】該抗原を投与する動物としては、ウサギ、ヤギ、3~20週令のラット、マウス、ハムスター等をあげることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 $\mu$ gが好ましい。抗原としてペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを用いることができる。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機によっても合成することができる。

【0120】該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

【0121】免疫に用いた抗原に対し、その血清が充分な抗体価を示した上記動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

【0122】分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル汎過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

#### (II) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分ペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示した上記動物を抗体産生細胞の供給源として供することができる。

【0123】該抗体価を示した上記動物に抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地(日本製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てて。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH 7.65)で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

【0124】例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1(以下、P3-U1と略す)〔Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)〕、SP2/0-Ag14(SP-2)〔Nature, 276, 269 (1978)〕、P3-X63-Ag8653(653)〔J. Immunol., 123, 1548 (1979)〕、P3-X63-Ag8(X63)〔Nature, 256, 495 (1975)〕等を用いることができる。

【0125】これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI-1640培地にグルタミン(1.5 mmol/L)、2-メルカプトエタノール(5×10<sup>-5</sup> mmol/L)、ジエンタマイシン(10 $\mu$ g/ml)および牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地(以下、正常培地という)に、さらに8-アザグアニン(15 $\mu$ g/ml)を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を2×10<sup>7</sup>個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH 7.2)でよく洗浄し、

細胞数が、抗体産生細胞：骨髄腫細胞=5～10：1になるよう混合し、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0126】得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、10<sup>8</sup>抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7ml を混合した溶液を0.2～1ml 添加し、更に1～2分間毎にMEM培地1～2mlを数回添加する。添加後、MEM培地を加えて全量が50ml になるように調製する。

【0127】該調製液を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスビペットによる吸込み、吹出でゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン (10<sup>-4</sup> mmol/L)、チミジン (1.5×10<sup>-5</sup> mmol/L) およびアミノブチリン (4×10<sup>-7</sup>M) を加えた培地〕100ml中に懸濁する。

【0128】該懸濁液を96穴培養用プレートに100μl/穴ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)] 等に記載されている 酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分ペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0129】酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分ペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識したラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0130】該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地 (HAT培地からアミノブチリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### (d) モノクローナル抗体の調製

アリストン処理 [2, 6, 10, 14-テトラメチルペントадекан (Pristane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する] した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5～20

×10<sup>6</sup>細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0131】該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

【0132】抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

#### (5-2) 本発明の抗体の利用

(a) 本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出および定量本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンプロット法、免疫組織染色法〔別冊 実験医学、ザ・プロトコールシリーズ、免疫染色・in situハイブリダイゼーション、羊土社 (1997)、Journal of Immunological Methods, 150, 5, (1992)〕等をあげることができる。

【0133】免疫学的定量法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、<sup>125</sup>I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

【0134】上記検出あるいは定量法は、大腸癌、胃癌等の診断に利用することができる。また、上記検出あるいは定量法を用いて本発明のポリペプチドを発現する細胞や細胞株を同定することができる。本発明のポリペプチドを発現する細胞や細胞株は、該ポリペプチドのリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストの探索や該ポリペプチドの機能解析に有用である。

#### (b) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明の抗体は、医薬、例えば視床または小脳の異常症、大腸癌、胃癌等の疾患の治療薬として用いることができる。

【0135】本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として該化合物単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0136】投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座

剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0137】経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シリップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシリップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0138】非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0139】投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\text{ }\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{ mg}/\text{kg}$ である。

(6) 本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドの利用

(6-1) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対するリガンドのスクリーニング方法

本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドを用いて、本発明のポリペプチドに対するリガンドを探索、決定できる。

【0140】該リガンドを探索または決定する方法としては、例えば本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドもしくはそれらの塩と、試験物質とを接触させ、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択する方法、または本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞や該細胞の膜画分と、試験物質とを接触させ、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択する方法等をあげることができる。

【0141】試験物質としては、公知のリガンド〔例えば、アンギオテンシン、ポンベシン、カナビノイド、コ

レシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(ピチュイタリアデニレートシクラーゼ アクティベイティング プロテイン)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH(グロースホルモン リリーシング ホルモン)、CRF(コルチコトロビン リリーシング ファクター)、ACTH(アドレノコルチコトロビック ホルモン)、メラニンスティミュレーションホルモン、GRP(ガストリン リリーシング ペプチド)、PTH(パラチロイド ホルモン)、VIP(バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッド ペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグラジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン〔例えば、IL-8(インターロイキン-8)、GRO $\alpha$ (グロース リレーティッド ジーン $\alpha$ )、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2(ニューロナル カルモジュリン バインディング プロテイン-2)、ENA-78(エビセリアルセルーデライブド ニュトロフィルーアクティベーティング プロテイン-78)、PF4(プレートレット ファクター4)、IP10(インターフェロン $\gamma$  インデューシブル プロテイン オブ 10k $d$ )、GCP-2(グラニュロサイト ケモタクティック プロテイン-2)、MCP-1(モノサイト ケモアトラクタント プロテイン-1)、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ (マクロファージ インスマタトリ プロテイン1 $\alpha$ )、MIP-1 $\beta$ 、RANTES(レギュレーティッド オン アクチベーション、ノーマル Tセル エクスプレスドアンド セクレッタード)など〕、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、ウロテンシンIおよびII、ニューロペプチドFF、オレキシンおよびメラニンコンセントレーティングホルモンなど〕の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物や該抽出物由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物などの生体試料や、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などがあげられる。

【0142】具体的な本発明のポリペプチドに対するリガンドの探索または決定方法としては、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド、もしくはその塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞に対して試験物質を作用させ、本発明のポリペプチド

または部分ペプチド、若しくはその塩に対する試験物質の結合量を測定する、あるいは本発明のポリペプチドを発現する細胞の応答を検出する方法をあげることができる。

【0143】より具体的には、(a) 標識した試験物質を、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドもしくはそれらの塩に接触させた場合における、標識した試験物質の該ポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはそれらの塩に対する結合量を測定し、該試験物質から本発明のポリペプチドまたはその塩に対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(b) 標識した試験物質を、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験物質の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、該試験物質から本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(c) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したGTP $\gamma$ SのG $\alpha$ 蛋白質への結合量を測定し、試験物質から本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(d) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合におけるGTPase活性を測定し、試験物質より本発明のペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、

(e) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞に接触させた場合における、ポリペプチドを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、をあげることができる。

【0144】以下に、本発明のリガンドを探索、または決定する方法をより詳細に説明する。

#### (I) 試験物質の結合量を測定する方法

上記(a)および(b)に示したように、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはその塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞に対して標識した試験物質を作用させ、本発明のポリペプチドに対する試験物質の結合量を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンド選択することにより、本発明のポリペプチドに対するリガンドを探

索または決定することができる。

【0145】試験物質としては、例えば、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P等の放射性同位元素で標識した公知のGPCRのリガンド〔アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、メラニンスティミュレーションホルモン、GRP、PTH、VIP、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグラジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、ウロテンシンIおよびII、ニューロペプチドFF、オレキシンおよびメラニンコンセントレーティングホルモンなど〕を用いることができる。また、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P等の放射性同位元素で標識した任意の蛋白質、ペプチドまたは化合物を用いることができる。

【0146】上記方法において、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとして、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを直接用いることもできるが、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞そのもの、またはその細胞膜画分を用いることもできる。細胞膜画分を用いる際の部分ペプチドとしては、リガンド結合能を有する親水性部位と細胞膜貫通領域である疎水性部位の両方を有する部分ペプチドが好ましい。該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。

【0147】また、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとして、天然に存在するポリペプチドまたは部分ペプチド、あるいは遺伝子組換えの手法を用いて作製した組換えポリペプチドまたは組換え部分ペプチドのいずれも用いることができる。本発明のポリペプチドとして、(3)に記載の方法により、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAに変異を導入して得られる変異DNAにコードされるポリペプチドのうち、構成的に活性型となった変異型ポリペプチドは特に有用である。

【0148】G蛋白質共役型受容体(GPCR)の中には、GPCRポリペプチドを細胞に過剰に発現させた際に、リガンドが存在しなくてもシグナルを流すものが存在し、これらは構成活性型GPCRと呼ばれる。また、

もともとは構成活性型ではないGPCRにおいても、アミノ酸の置換、欠失などの変異を導入することにより構成活性型になることが知られている。構成活性型に変化した変異GPCRでは、アゴニストとの親和性が増加する場合があることが知られていることから、構成活性型の変異GPCRはリガンドの探索において有用と考えられる〔Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、Endocrinology, 137, 3936 (1996)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)〕。

【0149】該構成活性型GPCRは既知の方法に従つて取得することができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、Science, 268, 98 (1995)、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)、Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 17, 57 (1997)、W098/46995〕。

【0150】上記の細胞膜画分とは、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500~3000 rpm) で短時間 (通常、約1~10分間) 遠心分離し、上清をさらに高速 (15000~30000 rpm) で通常30分~2時間遠心分離し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した受容体蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0151】本発明のポリペプチドを発現する細胞としては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などがあげられるが、該形質転換体が生産する本発明のポリペプチドが高次構造を保ち、リガンドとの結合性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。

【0152】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞やその細胞膜画分中のポリペプチドまたは部分ペプチドの量は、例えば1細胞当たり $10^3$ ~ $10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5$ ~ $10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニン

グ系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0153】以下、具体例を示す。

【0154】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の細胞膜画分を、適当なバッファーに懸濁することにより本発明のポリペプチドの標品を調製する。バッファーは、リガンドと本発明のポリペプチドとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよく、例えばpH4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸バッファーやTris-HClバッファーなどが用いられる。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80、ジギトニン、デオキシコール酸などの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明のポリペプチドやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチド、E-64、ペプチダーゼ阻害剤を添加することもできる。10μl~10mlの該ポリペプチド標品に、放射性同位元素 ( $^3$ H、 $^{125}$ I、 $^{14}$ C、 $^{35}$ S、 $^{32}$ Pなど) で標識した一定の放射能量の試験物質を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識の試験物質を加えた反応チューブも用意する。反応は約0~50°C、望ましくは約4~37°Cで、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、ガラス纖維涙紙等で涙過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維涙紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはアーカウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) が0cpmを越える試験物質を本発明のポリペプチドに結合する物質として選択することができる。これらの内、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の細胞膜画分への結合活性が強く、かつ本発明のポリペプチドを含有しない細胞または該細胞の細胞膜画分への結合活性が弱い物質を、本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0155】上記方法において、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる該ポリペプチドまたは該部分ペプチド発現細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって作製した該ポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行なうことができる。

(II) GTPγSのGα蛋白質への結合量を測定する方法

上記(c)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞の膜画分に試験物質を接触させ、

標識したGTP $\gamma$ SのG $\alpha$ 蛋白質（膜画分）への結合量を測定することにより、該ポリペプチドのリガンドを探索または決定することができる〔Molecular Pharmacology, 47, 848 (1995)、W098/46995〕。

【0156】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。標識したGTP $\gamma$ Sとしては、例えば $^{35}$ Sで標識したGTP $\gamma$ Sを用いることができる。

【0157】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記（I）に記載したものを使用することができる。

【0158】以下、具体例を示す。

【0159】本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞膜画分標品を、上記（I）に記載した方法により調製する。10 $\mu$ l～10mlの該ポリペプチド標品に、試験化合物、放射性同位元素（ $^{35}$ Sなど）で標識した一定の放射能量のGTP $\gamma$ S、およびGDPを共存させる。非特異的結合量（NSB）を知る必要がある場合は、大過剰の未標識のGTP $\gamma$ Sを加えた反応チューブを用意する。全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が特異的結合量である。反応は約0～50℃、望ましくは約4～37℃で、約20分～24時間、望ましくは約30分～3時間行なう。反応後、ガラス纖維涙紙等で涙過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維涙紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。同様の操作を本発明のポリペプチドを発現しない細胞または細胞膜画分を用いて行い、放射活性を測定する。

【0160】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際のGTP $\gamma$ Sの細胞または該細胞の膜画分への結合活性と、本発明のポリペプチドを発現していない細胞または該細胞の膜画分を用いた際の、GTP $\gamma$ Sの細胞または細胞膜画分への結合活性を比較し、試験試料より、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際にGTP $\gamma$ Sの膜画分への結合を増強する活性が強い物質を、本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0161】上記方法において、本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞

にベクターのみを導入することによって作製した、本発明のポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行なうことができる。

（III）GTPase活性を測定する方法

上記（d）に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞の膜画分に試験物質を接触させ、GTPase活性を測定することにより、本発明のポリペプチドのリガンドを探索または決定することができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、W098/46995〕。

【0162】試験物質としては、上記（II）に記載した物質を使用することができる。

【0163】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記（I）に記載したものを使用することができる。

【0164】以下、具体例を示す。

【0165】本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞膜画分標品を、上記（I）に記載した方法により調製する。10 $\mu$ l～10mlの該ポリペプチド標品に、試験化合物、放射性同位元素（ $^{32}$ Pなど）で標識した一定の放射能量のGTP（例えば[ $\gamma$  $^{32}$ P]GTP）を共存させる。反応は約0～50℃、望ましくは約4～37℃で、約20分～24時間、望ましくは約30分～3時間行なう。反応後、反応液の上清を回収し、遊離した[ $\gamma$  $^{32}$ P]Piの放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。反応液をガラス纖維涙紙等で涙過し、適量の同バッファーで洗浄した後、涙過液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測してもよい。同様に、本発明のポリペプチドを含有しない細胞または細胞膜画分についても、涙過液中の放射活性を測定する。

【0166】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際のGTPase活性と、本発明のポリペプチドを発現していない細胞または該細胞の膜画分を用いた際のGTPase活性を比較し、試験化合物中より、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際にGTPase活性を増強する活性が強い化合物を本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0167】上記方法において、本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって作製した、本発明のポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行なうことができる。

（IV）細胞の応答を検出する方法

上記(e)に示したように、本発明のポリペプチドを発現する細胞に試験物質を接触させ、該ポリペプチドの活性化を細胞の応答を指標として検出することにより、該ポリペプチドのリガンドを探索または決定することができる。細胞の応答としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などをあげることができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、Science, 268, 98 (1995)、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)、Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 17, 57 (1997)、Endocrinology 138, 1400 (1997)、Endocrinology 138, 1471 (1997)、Nat. Biotechnol., 16, 1334 (1998)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 471 (1998)、Brit. J. Pharmacol., 125, 1387 (1998)、Trends Biotechnol., 15, 487 (1997)、Anal. Biochem., 252, 115 (1997)、Nature, 358, 325 (1992)、Nature, 393, 272 (1998)、Cell, 92, 573 (1998)、J. Biol. Chem., 272, 27497 (1997)、Trends Pharmacol. Sci., 18, 430 (1997)、Trends Pharmacol. Sci., 20, 370 (1999)、W098/46995〕。

【0168】レポーター系を用いて細胞の応答をモニターする場合は、例えば、本発明のポリペプチドを発現する細胞に、該ポリペプチドの活性化により発現が誘導される遺伝子のプロモーター配列の下流に適当なレポーター遺伝子を連結したDNAを導入することにより、該ポリペプチドの活性化をレポーター遺伝子の発現で測定することができる。該プロモーターとしては、例えばICAM-1遺伝子のプロモーター、c-fosのプロモーター、Krox-24のプロモーター〔Biochem. J., 320, 145 (1996)〕などが利用できる。また、該プロモーターは、適当な転写因子の結合配列と基本プロモーターからなる人工プロモーターでもよい。転写因子の結合配列としては、例えばCRE (CREB binding element)、TRE (TPA responsive element)、SRE (serum responsive element) などが利用できる。レポーター遺伝子としては、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、β-グルクロニダーゼ遺伝子、β-ガラクトシダーゼ遺伝子、β-ラクタマーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子などが利用できる。

【0169】上記方法で用いられる本発明のポリペプチドを含有する細胞としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0170】本発明のポリペプチドを発現する細胞とし

ては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などを用いることができるが、該形質転換細胞が発現する該ポリペプチドが高次構造を保ち、リガンドとの結合性や機能性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。また酵母の変異株や改変Gα蛋白質を発現させた酵母などを宿主として利用することもできる〔Trends in Biotechnology, 15, 487 (1997)、Mol. Cell. Biol., 15, 6188 (1995)、Mol. Cell. Biol., 16, 4700 (1996)〕。

【0171】試験物質としては、上記(II)に記載した物質を使用することができる。

【0172】以下具体例を示す。

【0173】本発明のポリペプチドを発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。培養後、必要に応じて新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物を添加して一定時間インキュベートする。その後、細胞の応答（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など）を測定する。例えば、上記細胞の抽出液や上清を用いて、該細胞の応答により生成した産物を常法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加して定量してもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞のcAMP産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0174】同様の操作を、本発明のペプチドを発現しない細胞についても行い、上記の細胞の応答を測定する。

【0175】本発明のポリペプチドを含有する細胞を用いた際の細胞の応答と、本発明のポリペプチドを発現していない細胞を用いた際の細胞の応答を比較し、試験物質より、本発明のポリペプチドを含有する細胞を用いた際に細胞の応答が強く検出される物質を、本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0176】上記方法において、本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現し

ない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって作製した、本発明のポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行うことができる。

(6-2) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対するリガンドのスクリーニング用キット

本発明のポリペプチドまたはその塩に結合するリガンドのスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドもしくはそれらの塩、本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドを含有する細胞、または該細胞の膜画分などを含有する。本発明のリガンドのスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

(a) リガンドスクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで沪過濾し、4°Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド標品

本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10<sup>5</sup>個/穴で継代し、5%CO<sub>2</sub>、95%air インキュベーター中、37°Cで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化した化合物。該化合物の水溶液状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μmol/Lに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物の100～1000倍濃度に調製した非標識化合物。

(b) 測定法

①12穴組織培養用プレートを用いて培養した本発明のポリペプチドを発現するCHO細胞を、測定用緩衝液1mLで2回洗浄した後、490μLの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5μL加え、室温で1時間反応させる。非特異的結合量を知るために非標識試験化合物を5μL加えておいたものを準備してもよい。

③反応液を除去し、1mLの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を溶解液(0.2mM/L NaOH、1%SDS)で溶解し、4mLの

液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定する。

【0177】本発明のポリペプチドのリガンドとしては、例えば、脳、視床下部、下垂体、臍臍などに存在する物質などが挙げられるが、本発明のリガンドには、既知のリガンドは含まれない。既知のリガンドとしては、アンギオテンシン、ポンペシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、メラニンスティミュレーションホルモン、GRP、PTH、VIP、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグラジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ-ケモカイン (例えば、IL-8、GROα、GROβ、GROγ、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1α、MIP-1β、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリシン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、ウロテンシンIおよびII、ニューロペプチドFF、オレキシンおよびメラニンコンセントレーティングホルモンなどがあげられる。

(6-3) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対するリガンドの定量法

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩と接触させることによって、被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、既知の方法 (入江寛編「ラジオイムノアッセイ」 (講談社、昭和49年発行)、入江寛編「統ラジオイムノアッセイ」 (講談社、昭和54年発行) ) あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。

(6-4) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞や該細胞の膜画分は、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択するための試薬として有用である。

【0178】本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法としては、例えば、(A) ①本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩と、リガンドとを接触させた場合と、②本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩と、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行ない、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする方法、(B) ①本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを発現する細胞または該細胞膜画分と、リガンドとを接触させた場合と、②本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを発現する細胞または該細胞膜画分と、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行ない、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする方法、(C) 上記(6-1)の(a)～(d)に記載した本発明のポリペプチドのリガンドの探索法と同じ方法を用いることを特徴とする方法、をあげることができる。

【0179】また、上記(6-1)の(a)～(d)に記載した本発明のポリペプチドのリガンドの探索法においては(6-1)に記載した構成活性型の変異ポリペプチドを用いることを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法もあげることができる。

【0180】より具体的には、(a) ①標識したリガンドを、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドもしくはそれらの塩に接触させた場合と、②標識したリガンドおよび試験物質を本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩に接触させた場合における、標識したリガンドの該ポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩に対する結合量を測定して比較し、標識したリガンドより本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(b) ①標識したリガンドを、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、②標識したリガンドおよび試験物質を本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定して比較し、標識したリガンドより本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(c) ①リガンドを本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、②リガンドと試験物質

を本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したGTP $\gamma$ SのG $\alpha$ 蛋白質（膜画分）への結合量を測定して比較し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択するを特徴とする本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、（d）①リガンドを本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、②リガンドと試験物質を本発明の受容体蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合におけるGTPase活性を測定して比較し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、（e）①リガンドを本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、②リガンドと試験物質を本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における本発明のポリペプチドを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など）を測定して比較し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、（f）試験物質を本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したGTP $\gamma$ SのG $\alpha$ 蛋白質（膜画分）への結合量を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、（g）試験物質を本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合におけるGTPase活性を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、（h）試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞に接触させた場合における、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、メラニン色素の凝集または

拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性などを測定し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(i) 上記(a)～(h)において、本発明のポリペプチドとして構成活性型に変異させたポリペプチドを使用することを特徴とする本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、をあげることができる。

【0181】上記(a)および(b)で選択された物質は、上記(c)～(i)の方法を用いて、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質かを区別することができる。一方、上記(a)～(i)の方法で選択された物質の中には、本発明のポリペプチドのアゴニストやアンタゴニストではないが、本発明のポリペプチドの機能を修飾できる物質（機能修飾物質）も含まれる。例えば、(a)～(i)の方法で選択された物質の中には、本発明のポリペプチドとG蛋白質の共役を阻害したり増強したりする物質も含まれると考えられる。また、

(c)～(i)の方法で選択された物質の中には、本発明のポリペプチドより下流のシグナルを阻害したり増強する物質も含まれると考えられる。これら機能修飾物質も医薬品の候補として有用である。

【0182】上記方法による本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法の詳細な説明を以下にする。

#### (I) リガンドの結合量を測定する方法

上記(a)および(b)に示したように、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはそれらの塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞に対して試験物質と標識したリガンドを作用させ、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはその塩に対するリガンドの結合量を測定することにより、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニングを行うことができる。

【0183】標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などを用いることができる。例えば [<sup>3</sup>H]、 [<sup>125</sup>I]、 [<sup>14</sup>C]、 [<sup>35</sup>S] などで標識されたリガンドなどを用いることができる。

【0184】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成され

た化合物などを使用することができる。

【0185】本方法に用いる本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとしては、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよく、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞から精製した該ポリペプチドまたは部分ペプチドでもよいし、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞そのものまたはその細胞膜画分を用いてもよい。該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。

【0186】また、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとしては、天然に存在するポリペプチドまたは部分ペプチド、あるいは遺伝子組換えの手法を用いて作製した組換えポリペプチドまたは組換え部分ペプチドのいずれでもよいが、(3)に記載の方法により、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAに変異を導入して得られる変異DNAにコードされるポリペプチドのうち、構成的に活性型となった変異型ポリペプチドは特に有用である。

【0187】構成活性型に変異したGPCRについては(6-1)に記載したように、該変異GPCRでは、アゴニストとの親和性が増加する場合があることが知られていることから、構成活性型の変異GPCRはアゴニストの探索において有用である。アンタゴニストの探索には、普通はリガンドを使用する必要があるが、リガンドが不明のGPCR（オーファンGPCRと呼ばれる）の場合はリガンドを使用することができない。しかし、天然型または変異型の構成活性型GPCRを用いれば、リガンドがなくてもアンタゴニストの探索が可能になる。例えば、構成活性型GPCRポリペプチドを細胞に過剰に発現させた際に流れるシグナルやG蛋白質の活性化を抑制する物質を探索することにより、アンタゴニストを選択することが可能である。この際、アンタゴニストとともにGPCRの機能修飾物質も選択されうる。また、構成活性型GPCRポリペプチドを細胞に過剰に発現させた際に流れるシグナルやG蛋白質の活性化を増強する物質を探索することにより、アゴニストや機能修飾物質も選択することができる。

【0188】GPCRに変異が生じて構成活性型に変化したことが原因で起こる疾患が多数知られている〔日本臨床、56、1658 (1998)、日本臨床、56、1843 (1998)、日本臨床、56、1856 (1998)、日本臨床、56、1931 (1998)、Trends in Endocrinology and Metabolism、9、27 (1998)、Endocrinology、137、3936 (1996)〕。これらの構成活性型変異GPCRの活性を抑制できるアンタゴニスト（インバースアゴニストと呼ばれる）は、構成活性型変異GPCRが原因で起こる疾患の治療に有用である。アンタゴニストは、ニュートラルアンタゴニストとインバースアゴニストに分類される。インバースアゴニ

ストは構成活性型GPCRの活性を抑制することができるが、ニュートラルアンタゴニストは構成的活性を抑制することができない。構成活性型変異GPCRは、インバースアゴニストの探索に有用である。

【0189】上記方法に用いられる細胞膜画分は、上記(6-1)に記載した方法により調製することができる。

【0190】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞としては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。宿主細胞としては大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などが用いられる。該形質転換細胞が発現する本発明のポリペプチドが高次構造を保ち、リガンドとの結合性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。酵母の変異株や改変G $\alpha$ 蛋白質を発現させた酵母などを宿主として利用することもできる〔 *Trends in Biotechnology*, 15, 487 (1997)、*Mol. Cell. Biol.*, 15, 6188 (1995)、*Mol. Cell. Biol.*, 16, 4700 (1996)〕。

【0191】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞やその細胞膜画分中のGPCRの量は、1細胞当たり $10^3$ ～ $10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5$ ～ $10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0192】以下、具体例を示す。

【0193】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの標品を、上記(6-1)に記載した方法により調製する。 $10\mu l$ ～ $10ml$ の該ポリペプチドまたは部分ペプチド標品に、試験物質と放射性同位元素( $^3H$ 、 $^{125}I$ 、 $^{14}C$ 、 $^{35}S$ 、 $^{32}P$ など)で標識した一定の放射能量のリガンドを共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0～50℃、望ましくは約4～37℃で、約20分～24時間、望ましくは約30分～3時間行なう。反応後、ガラス纖維涙紙等で涙過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維涙紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはアーカウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が特異的結合量である。試験物質非存在下におけるリガンドの特異的結合量と、試験物質存在下におけるリガンドの特異的結合量を比較して、リガンドの特異的結合量を減少させ

る物質を本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

【0194】上記方法において、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって得られる他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(II) GTP $\gamma$ SのG $\alpha$ 蛋白質への結合量を測定する方法

上記(c)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分に試験物質とリガンドを接触させ、標識したGTP $\gamma$ SのG $\alpha$ 蛋白質(膜画分)への結合量を測定することにより、該GPCRのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる〔*Molecular Pharmacology*, 47, 848-854 (1995)、W098/46995〕。

【0195】また、上記(f)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分に試験物質を接触させ、標識したGTP $\gamma$ SのG $\alpha$ 蛋白質(膜画分)への結合量を測定することにより、該ポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる〔*Molecular Pharmacology*, 47, 848-854 (1995)、W098/46995〕。

【0196】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。標識したGTP $\gamma$ Sとしては、例えば $^{35}S$ で標識したGTP $\gamma$ Sを用いることができる。

【0197】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0198】以下、具体例を示す。

【0199】本発明のポリペプチド標品を、上記(6-1)に記載した方法により調製する。

【0200】アゴニストのスクリーニングの際には、10μl～10mlの該ポリペプチド標品に、試験物質、放射性同位元素(<sup>35</sup>Sなど)で標識した一定の放射能量のGTP<sub>γ</sub>S、およびGDPを共存させる。非特異的結合量(NSB)を知る必要がある場合には、大過剰の未標識のGTP<sub>γ</sub>Sを加えた反応チューブを用意する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が特異的結合量である。反応は約0～50℃、望ましくは約4～37℃で、約20分～24時間、望ましくは約30分～3時間行なう。反応後、ガラス繊維涙紙等で涙過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維涙紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。GTP<sub>γ</sub>Sの膜画分への結合を増強する活性を有する物質を、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

【0201】アンタゴニストや機能修飾物質のスクリーニングの際には、10μl～10mlの上記ポリペプチド標品に、リガンド、試験物質、放射性同位元素(<sup>35</sup>Sなど)で標識した一定の放射能量のGTP<sub>γ</sub>S、およびGDPを共存させて同様の実験を行う。試験物質非存在下におけるGTP<sub>γ</sub>Sの結合量と、試験物質存在下におけるリガンドの結合量を比較して、GTP<sub>γ</sub>Sの結合量を減少させる物質を本発明のポリペプチドのアンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。一方、GTP<sub>γ</sub>Sの結合量を増加させる物質を本発明のポリペプチドの機能修飾物質またはアゴニストとして選択することができる。

【0202】本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換えDNAを導入して得られる該ポリペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって作製した他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

### (III) GTPase活性を測定する方法

上記(d)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分にリガンドと試験物質を接触させ、GTPase活性を測定することにより、該ポリペプチ

ドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857-1860 (1996)、W098/46995〕。

【0203】また、上記(e)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分に試験物質を接触させ、GTPase活性を測定することにより、該ポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857-1860 (1996)、W098/46995〕。

【0204】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知PCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。

【0205】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0206】以下、具体例を示す。

【0207】本発明のポリペプチド標品を、上記(6-1)に記載した方法により調製する。

【0208】アゴニストのスクリーニングの際には、10μl～10mlの該ポリペプチド標品に、試験化合物、放射性同位元素(<sup>32</sup>Pなど)で標識した一定の放射能量のGTP(例えば[<sup>32</sup>P]GTP)を共存させる。反応は約0～50℃、望ましくは約4～37℃で、約20分～24時間、望ましくは約30分～3時間行なう。反応後、反応液の上清を回収し、放出された[<sup>32</sup>P]Piの放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。反応液をガラス繊維涙紙等で涙過し、適量の同バッファーで洗浄した後、涙過液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測してもよい。GTPase活性を増強する活性を有する物質を、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

【0209】アンタゴニストや機能修飾物質のスクリーニングの際には、10μl～10mlの該ポリペプチド標品に、リガンド、試験化合物、放射性同位元素(<sup>32</sup>Pなど)で標識した一定の放射能量のGTP(例えば[<sup>32</sup>P]GTP)を共存させて同様の実験を行う。試験物質非存在下におけるGTPase活性と、試験物質存在下におけるGTPase活性を比較して、GTPase活性を減少させる物質を本発明のポリペプチドのアンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。一方、GTPase活性を増加させる物質を本発明のポリペプチドの機能修飾物質またはアゴニストとして選択することができる。

【0210】本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入することによって得られる該ポリペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって得られる他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(IV) 細胞の応答を検出する方法

上記(e)に示したように、本発明のポリペプチドを発現する細胞にリガンドと試験物質を接触させ、該ポリペプチドの活性化を細胞の応答を指標として検出することにより、該ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる。

【0211】また、上記(h)に示したように、本発明のポリペプチドを発現する細胞に試験物質を接触させ、該ポリペプチドの活性化を細胞の応答を指標として検出することにより、該ポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる。

【0212】細胞の応答としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散などを測定する。また、レポーター系を用いて細胞の応答をモニターすることもできる。例えば、機能的な本発明のポリペプチドを発現する細胞に、該ポリペプチドの活性化により発現が誘導される遺伝子のプロモーター配列の下流に適当なレポーター遺伝子を連結したDNAを導入することにより、該ポリペプチドの活性化をレポーター遺伝子の発現で測定することができる。該プロモーターとしては、例えばICAM-1遺伝子のプロモーター、c-fosのプロモーター、Krox-24のプロモーターなどが利用できる。また、該プロモーターは、適当な転写因子の結合配列と基本プロモーターからなる人工プロモーターでもよい。転写因子の結合配列としては、例えばCRE、TRE、SRE、などが利用できる。レポーター遺伝子としては、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、β-グルクロニダーゼ遺伝子、β-ガラクトシダーゼ遺伝子、β-ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子および

グリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子などが利用できる。

【0213】本発明のポリペプチドを発現する細胞としては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように、大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などが用いられる。該形質転換細胞が発現する本発明のポリペプチドが高次構造を保持し、リガンドとの結合性や機能性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。酵母の変異株や変異Gα蛋白質を発現させた酵母などを宿主として利用することもできる。

【0214】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。

【0215】以下具体例を示す。

①アゴニストのスクリーニング方法

本発明のポリペプチドを発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。必要に応じて新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験物質を添加して一定時間インキュベートする。その後、細胞の応答（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など）を測定する。例えば、細胞の抽出液や上清を用いて、細胞の応答により生成した産物を常法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加して定量してもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞のcAMP産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞の応答を増強する活性を有する物質を、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

②アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング

本発明のポリペプチドを発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。必要に応じて新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、リガンドと試験物質を添加して一定時間インキュベートする。その後、上記と同様の方法により細胞の応答を測定する。試験物質非存在下における細胞応答と、試験物質存在下における細胞応答を比較して、細胞応答を減少させる物質を本発明のポリペプチドのアンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。一方、細胞応答を増加させる物質を本発明のポリペプチドの機能修飾物質またはアゴニストとして選択することができる。

【0216】本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換えDNAを導入して得られる該ポリペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質により感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって得られる他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(6-5) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キット

本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩、または本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を含有するものなどである。本発明のスクリーニング用キットとして、たとえば下記の試薬と測定法をあげることができる。

#### (a) スクリーニング用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで沪過濾し、4°Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②本発明のポリペプチド標品

本発明のポリペプチドを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10<sup>5</sup>個/穴で継代し、5%CO<sub>2</sub>、95%air インキュベーター中、37°Cで2日間培養したもの。

##### ③標識リガンド

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したリガンド。水溶液の状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μmol/Lに希釈する。

##### ④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mmol/Lとなるように溶解し、-20°Cで保存する。

##### (b) 測定法

① 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のポリペプチド発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mLで2回洗浄した後、490μLの測定用緩衝液を各穴に加える。

② 10<sup>-3</sup>～10<sup>-10</sup> mol/Lの試験物質溶液を5μL加えた後、標識リガンドを5μL加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験物質のかわりに10<sup>-3</sup> mol/Lのリガンドを5μL加えておく。

③ 反応液を除去し、1mLの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを溶解液 (0.2mol/L NaOH、1%SDS) で溶解し、4mLの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④ 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を下記式で求める。

$$PMB = (B - NSB) \div B_0 \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

上記(6-4)のスクリーニング方法または本スクリーニング用キットを用いて得られる物質またはその塩は、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質である。該物質としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよいが、該公知物質は、本発明のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質には含まれない。本発明のポリペプチドに対するアゴニストは、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。逆に、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストは、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。また、本発明のポリペプチドの機能修飾物質は、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性を増強または抑制することができるので、該リガンド活性を増強または抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

【0217】上記(6-4)のスクリーニング方法または本スクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常法に従って製剤化することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスター、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0218】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノール)、ポリアルコール(例えば、プロピレンギリコール、ポリエチレンギリコール)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレンギリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法

などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(7) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドの利用

(7-1) 本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子の取得および該遺伝子の利用

(I) 本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子の取得

本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社(1993年)〕を用いて、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子および該遺伝子の発現制御領域を取得することが可能である。

【0219】また、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、公開されているデータベースに登録されているヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、その構造を明らかにできる可能性がある。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、本発明のDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のエクソンおよびインtron構造、ならびに該染色体遺伝子の発現制御領域(例えばプロモーター領域など)を決定することができる。

【0220】プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域があげられる。具体的には、例えば、ヒトの視床、小脳、全脳、海馬、黒質、胎児脳、胎児腎、胎児肝臓、心臓、肝臓、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、胸腺、甲状腺、子宮、ヒト大腸癌細胞、またはヒト胃癌細胞において、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するプロモーター領域をあげることができる。

【0221】上記プロモーター領域の具体的な例としては、配列番号15に記載の塩基配列において塩基番号20202~25202番で表される塩基配列を有するDNA中、50~5000bpの連続した塩基配列を有するDNAをあげることができる。

(II) 本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子および該遺伝子の利用方法

下記(8)で示すように、該プロモーター領域は本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する物質のスクリーニングに有用である。また、該プロモーター領域の配列情報を用いて、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を抑制するためのデコイDNA [Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 56, 563 (1998)、Circulation Research, 82, 1023 (1998)、Experimental Nephrology, 5, 429 (1997)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996)]を作製することができる。

(7-2) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物量の測定

ノーザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)、PCR法(PCR Protocols, Academic Press (1990))、定量的PCR法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990)]、Real Time PCR法[Junko Stevens, 実験医学(増刊), 15, 46 (1997)]等の方法により、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物量を測定することができる。特に、定量的PCR法やReal Time PCR法は定量性に優れている点で好ましい方法である。該転写産物を定量することにより、本発明のポリペプチドの発現異常に基づく疾患の診断が可能である。したがって、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を定量するための遺伝子診断剤として有用である。

(7-3) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子の変異および多型の検出

GPCR遺伝子またはGPCR遺伝子の発現制御領域には変異や多型が存在することが知られている。例えば、GPCR遺伝子の変異によりGPCRの機能が不活性化または活性化し、各種の疾患が起こることが知られている〔日本臨床, 56, 1658 (1998)、日本臨床, 56, 1836 (1998)、日本臨床, 56, 1843 (1998)、日本臨床, 56, 1848 (1998)、日本臨床, 56, 1856 (1998)、日本臨床, 56, 1871 (1998)、日本臨床, 56, 1876 (1998)、日本臨床, 56, 1931 (1998)、Trends in Endocrinology and Metabolism, 9, 27 (1998)〕。また、GPCR遺伝子またはGPCR遺伝子の発現制御領域の変異によりGPCRの発現量が増加または低下し、各種の疾患が起こる場合もある。したがって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異を調べることにより、本発明の受容体蛋白質の機能の不活性化または活性化、あるいは本発明のポリペプチドの発現の増加または低下に基づく疾患の診断を行うことができる。

(0222) また、GPCR遺伝子やGPCR遺伝子の発現制御領域の多型により、GPCRの性質やGPCRの発現量が変化し、疾患の発症率や進展速度が異なることが知られている〔Cancer. Res., 59, 3561 (1999)、Ann. Rev. Immunol., 17, 657 (1999)、日本臨床, 56,

1871 (1998)〕。例えば、 $\beta_3$ アドレナリン受容体の64番目のトリプトファンがアルギニンに置換した該変異受容体蛋白質を有する人では、肥満や糖尿病の発症率が高いことが知られている。したがって、本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異を調べることにより、本発明のポリペプチドの性質や発現量の変化に基づく疾患の発症率や進展速度の予測を行うことができる。

【0223】また、現在使用されている薬剤の多くはGPCRをターゲットとしたものであるが、GPCR遺伝子やGPCR遺伝子の発現制御領域の多型により、GPCRの性質やGPCRの発現量が変化し、薬剤への感受性が変化することが知られている〔Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、J. Bilo. Chem., 272, 1822 (1997)、Pharmacogenetics, 5, 318 (1995)、J. Bilo. Chem., 274, 12670 (1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9608 (1998)、Science, 286, 487 (1999)〕。したがって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異を調べることにより、本発明のポリペプチドの性質や発現量の変化に基づく薬剤の感受性の予測を行うことができる。

【0224】本発明のポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異または多型の検出は、該遺伝子または該制御領域の塩基配列情報を用いて行うことができる。具体的には、サンプルット法、ダイレクトシークエンス法、PCR法、DNAチップ法などを用いて遺伝子の変異や多型を検出することができる〔臨床検査, 42, 1507-1517 (1998)、臨床検査, 42, 1565-1570 (1998)〕。

【0225】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNA、および本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現制御領域中の塩基配列を有するDNAを、プローブまたはプライマーとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子ならびに該遺伝子の発現制御領域の変異や多型を検出することができる。したがって、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNA、および本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現制御領域中の塩基配列を有するDNAは、上記変異や多型を検出するための遺伝子診断剤として有用である。

(7-4) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現量または機能が亢進した疾患の治療剤

アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕、トリ

ブル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕、リボザイム技術〔Current Opinion in Chemical Biology, 3, 274 (1999)、FEMS Microbiology Reviews, 23, 257 (1999)、Frontiers in Bioscience, 4, D497 (1999)、Chemistry & Biology, 6, R33 (1999)、Nucleic Acids Research, 26, 5237 (1998)、Trends in Biotechnology, 16, 438 (1998)〕、あるいはデコイDNA法〔Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 56, 563 (1998)、Circulation Research, 82, 1023 (1998)、Experimental Nephrology, 5, 429 (1997)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996)〕を用いて任意の遺伝子の発現を抑制することができる。

【0226】例えば、上記(2)に記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、あるいは本発明のポリペプチドをコードする転写産物の翻訳の抑制を行うことが可能である。すなわち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。

【0227】例えば、本発明のポリペプチドの発現増加または該ポリペプチドのリガンドの発現増加が原因で受容体を介した生理作用が亢進している患者がいる場合、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を患者に投与することにより、該生理作用を抑制することができる。すなわち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体は、本発明のポリペプチドの発現量または機能が亢進した疾患の治療剤として有用である。

【0228】本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を上記治療剤として使用する場合は、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記(6-5)に記載した常法に従って製剤化、処方および投与することができる。

(7-5) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現量または機能が低下した疾患の遺伝子予防・治療剤

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドの発現量または機能が低下した疾患の遺伝子予防・治療剤などの医薬として使用することができる。例えば、本発明のポリペプチドの発現低下や変異のためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、(i) 本発明のポリペプチドをコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ii) 対象となる細胞に本発明のポリペプチドをコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に

移植することなどによって、患者の体内における本発明のポリペプチドの量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドの発現量または機能が低下した疾患に対して安全で低毒性な遺伝子予防・治療剤として有用である。

【0229】本発明のポリペプチドをコードするDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記(7-4)に記載した常法に従って製剤化、処方および投与することができる。

(7-6) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子の転写または翻訳を制御する物質のスクリーニング方法

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御することにより、該ポリペプチドを介して発揮される細胞機能を制御することが可能である。したがって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性を増強または抑制することができるので、該リガンドの活性を増強または抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

【0230】該化合物は、以下(a)～(c)に示す方法により取得できる。

(a) [i] 本発明のポリペプチドを発現する細胞と、[ii] 試験物質の存在下、本発明のポリペプチドを発現する細胞を、上記(4)に記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記(5)で記載した本発明の抗体を用いて測定、比較し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

【0231】本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンプロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(b) [i] 本発明のポリペプチドを発現する細胞と、[ii] 試験物質の存在下、本発明のポリペプチドを発現する細胞を、上記(4)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードするDNAの転写産物量を、上記(7-2)で記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定、比較し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

(c) 上記(7-2)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラス

ミドを公知の方法により作製し、上記(5)に記載の方法に準じて動物細胞に導入し、形質転換体を取得する。

【i】該形質転換体と、【ii】試験物質の存在下、該形質転換体を、上記(5)に記載の培養法で2時間から1週間培養し、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社(1993)、Biotechniques, 20, 914 (1996)、J. Antibiotics, 49, 453 (1996)、Trends in Biochemical Sciences, 20, 448 (1995)、細胞工学, 16, 581 (1997)〕を用いて測定、比較し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する方法。

【0232】レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子またはグリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)遺伝子等をあげることができる。

(7-7) 本発明のDNAが欠損または置換した動物の作製

本発明のDNAが欠損または置換した動物は、本発明のDNAを含む遺伝子の全部または一部が欠損または置換しており、本発明のポリペプチドの発現量が変化した動物である。該動物、または該動物の臓器、組織または細胞は、上記の方法により取得される医薬、例えば、大腸癌、胃癌または視床、小脳の機能異常等の疾患の治療薬の評価に用いることができ、薬剤評価モデル動物、臓器、組織または細胞として有用である。

【0233】該動物は、本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等〕により不活性または任意の配列と置換した変異胚性幹細胞クローンを作成することができる〔Nature, 350, 243 (1991)〕。

【0234】このようにして作成した胚性幹細胞クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastcyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体(ノックアウト動物)を得ることができる。

【0235】このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の

位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中の塩基の欠失、置換若しくは付加等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。

【0236】またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。

【0237】このような例としては脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 1317 (1996)〕やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335 (1997)〕が知られている。

【0238】従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の塩基の欠失、置換若しくは付加をその翻訳領域や、発現制御領域に有する動物個体を作成することが可能である。

【0239】このような動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患、例えば、癌や視床または小脳の機能異常等の症状を誘導することができる。

【0240】従って、本発明のノックアウト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患、例えば、癌や視床または小脳の機能異常等の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0241】

【実施例】以下の実施例中に記載の方法については、とくに断らない限り、モレキュラー・クローニング第二版記載の方法に従って行った。

実施例1 新規G蛋白質共役型受容体(KATO6734Lポリペプチド)をコードするcDNAのクローン化(1)KATOIII細胞由来cDNAライブラリーの作製ヒト胃癌組織細胞株KATOIIIから、mRNAを抽出し、精製した。それぞれのpolyA(+)RNAよりオリゴキャップ法〔Gene, 138, 171 (1994)〕によりcDNAライブラリーを作成した。Oligo-cap linker(配列番号3で表される塩基配列を有するDNA)およびOligo dT primer(配列番号4で表される塩基配列を有するDNA)を用いて、蛋白質核酸 酶素, 41, 197 (1996)、Gene, 200, 149 (1997)記載の方法に従ってBAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)処理、TAP(Tobacco Acid Pyrophosphatase)処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、配列番号5で表される塩基配列を有するDNA(5'末端側)と配列番号6で表される塩基配列を有するDNA(3'末端側)をプライマ

一セットとして用いたPCRにより2本鎖cDNAに変換した後、制限酵素SfiIで切断した。該cDNAをDraIIIで切断したベクター pME18SFL3 (GenBank accession no. AB009864, Expression vector, 3392 bp) に組み込み、cDNAライブラリーを作製した。上記方法により、cDNAは発現が可能なように一方向に組み込まれる。

#### (2) ランダムシークエンス

上記(1)で調製したcDNAライブラリーの各大腸菌クローンから常法に従ってプラスミドDNAを取得し、各プラスミドが含有するcDNAの5'末端側の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Dye Terminator Cycle Sequencing FSReady Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction KitまたはBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(PE Biosystems社製)とDNAシークエンサー・ABI PRISM 377(PE Biosystems社製)を用いて行った。塩基配列決定用のプライマーとしては、配列番号7および8で表される塩基配列を有するDNAを使用した。

【0242】得られた塩基配列についてはBlast、Fast a、FrameSearch等のプログラムを利用して、相同性のある遺伝子や蛋白質の解析を行った。その結果、pME-KAT06734と名づけたプラスミドが含有するcDNA (KAT06734 cDNAと呼ぶ)は、ヒトバソプレッシン受容体やヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体と相同性を有する蛋白質をコードしていることがわかった。

(3) KAT06734 cDNAの全塩基配列の決定  
上記(2)で得られたpME-KAT06734が含有するcDNA (KAT06734 cDNA)の3'末端側の塩基配列も決定し、該cDNAの全塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、パーキンエルマー社のDNAシークエンサー377とApplied Biosystems社製の反応キット(ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit)を使用した。

【0243】KAT06734 cDNAは880 bpで、143アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた(配列番号19)。相同性解析およびハイドロパシー解析から、本cDNAのコードする蛋白質は、C末端を欠失した新規GPCRであると考えられた。

#### (4) ヒト視床からの完全長cDNA(KAT06734L cDNA)の取得

ヒト胃癌細胞株KATOIIIおよび大腸癌細胞株Colo205由來の全RNAを錆型として3'-RACE法を行うことにより、KAT06734 cDNAで欠失していた3'末端側のcDNA断片を取得した。3'-RACE法には、5'/3' RACEキット(ベーリングー社製)を用い、配列番号9で表される塩基配列を有するDNA(図7の06734-5-1)をKAT06734 cDNA特異的プライマーとして用いた。3'-RACE法で取得したcDNA断片の

配列を決定し、KAT06734 cDNAの配列と連結した配列(KAT06734-3')を作成した(図11～13参照)。本配列においては、途中でOpen Reading Frameがずれてしまうことから、再度PCRにより全長cDNAの取得を試みることとした。その際、癌細胞株ではスプライシング異常がある可能性が考えられたため、cDNAソースとしてはヒト正常組織(ヒト視床)を用いた。

【0244】下記の実施例4の方法で調製したヒト視床由來の1本鎖cDNAを錆型として、配列番号11で表される塩基配列を有するDNA(図7の06734SP5)と配列番号12で表される塩基配列を有するDNA(図10の06734-3-3)をプライマーセットとして用いてPCRを行い、新たなcDNA断片を取得した。PCR反応は、実施例4の(a)で合成したヒト視床由來の一本鎖cDNA(6.25 μl)に、Forwardプライマー(配列番号11に記載のDNA)を10 pmol、Reverseプライマー(配列番号12に記載のDNA)を10 pmol、2.5 mmol/L dNTP混合液を2.5 μl、5単位/μlのTakara Ex Taq™(Takara社製)を0.1 μl、10×反応緩衝液(Takara社製)を2.5 μl添加し、滅菌水を加えて全量を25 μlに調製した。サーマルサイクルDNA engine(MJ Research社製)を用い、95°C 5分間の熱処理によりDNAを変性させた後、96°Cで15秒間、68°Cで1分48秒間からなる反応を35サイクル行った。その後、さらに72°Cで10分間反応を行った。

【0245】上記PCRで増幅したcDNA断片の配列を、ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems社製)を用いたダイレクトシークエンスにより決定した。プライマーとしては、配列番号9、11、12で表される塩基配列を有するDNA、および配列番号18で表される塩基配列を有するDNA(図9の06734-3-2)を使用した。決定した塩基配列と、KAT06734 cDNAの5'末端側配列およびKAT06734-3'の3'末端側配列とを連結した配列を作成した(図7～10参照)。本合成配列を有するcDNAをKAT06734L cDNAと呼び、その塩基配列を配列番号2に示す。本cDNAは371アミノ酸の蛋白質をコードしていた(図7～10参照)。該アミノ酸配列を有するポリペプチドをKAT06734 Lポリペプチドと呼び、そのアミノ酸配列を配列番号1に示した。

【0246】ハイドロパシープロフィールから、該ポリペプチドは7つの膜結合領域を有すると考えられた(図1)。膜結合領域部分の具体的な予測はEMBO J., 12, 1693(1993)に記載の方法に従って行った。

【0247】該ポリペプチドは、アミノ酸レベルで既知のG蛋白質共役型受容体と相同性を有していたが、中で

もヒトバソプレッシン1A受容体、ヒトバソプレッシン1B受容体、ヒトバソプレッシン2受容体、ヒトオキシトシン受容体、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、ホワイトサッカーのバソトシン受容体と高い相同意を示した。KAT06734Lポリペプチドと上記既知G蛋白質共役型受容体のアミノ酸配列を用いて作成したデンドログラムを図14に示す。デンドログラムは、CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) を用いて作成した。同プログラムを用いて、KAT06734Lポリペプチドと上記既知GPCRのアミノ酸配列をアラインメントした結果を図2~6に示す。KAT06734Lポリペプチド中の予想される7つの膜貫通領域(TM1~TM7)を下線で示してある。

【0248】KAT06734Lポリペプチドはアミノ酸レベルで、ヒトバソプレッシン1A受容体と24.8%、マウスバソプレッシン1A受容体と26.4%、ヒトバソプレッシン1B受容体と27.8%、ヒトバソプレッシン2受容体と22.9%、ヒトオキシトシン受容体と25.6%、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体と19.0%、ホワイトサッカーのバソトシン受容体と26.7%の相同意を示した。

【0249】以上の結果から、該ポリペプチドは新規なG蛋白質共役型受容体であることが明らかになった。ヒトおよびマウスのバソプレッシン1A受容体、ヒトバソプレッシン1B受容体、ヒトバソプレッシン2受容体、ヒトオキシトシン受容体、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、ホワイトサッカーのバソトシン受容体の天然リガンドはいずれもペプチドであることから、該新規G蛋白質共役型受容体のリガンドもペプチドであると推定された。また、該新規G蛋白質共役型受容体は上記既知G蛋白質共役型受容体と19.0~27.8%の相同意を示すことから、該新規G蛋白質共役型受容体のリガンドは、上記既知G蛋白質共役型受容体のリガンドとは異なると推定された。

#### 実施例2 KAT06734Lポリペプチドのヒト培養細胞株における発現

##### (1) pBS-KAT06734Lの造成

下記の実施例4の方法で調製したヒト視床由来の1本鎖cDNAを錆型として、配列番号13で表される塩基配列を有するDNA(図7の06734-F)と配列番号14で表される塩基配列を有するDNA(図9の06734-R)をプライマーセットとして用いてPCRを行い、KAT06734LポリペプチドをコードするcDNA断片を取得した。PCR反応は、後述の実施例4の(a)で合成したヒト視床由来の一本鎖cDNA(6.25μl)に、Forwardプライマー(配列番号13で表される塩基配列を有するDNA)を10pmol、Reverseプライマー(配列番号14で表される塩基配列を有するDNA)を10pmol、2.5mmol/L dNTP

混合液を2.5μl、5単位/μlのTakara Ex Taq<sup>TM</sup>(Takara社製)を0.1μl、10×反応緩衝液(Takara社製)を2.5μl添加し、滅菌水を加えて全量を25μlに調製した。サーマルサイクルDNA engine (MJ Research社製)を用い、95℃で5分間、熱処理によりDNAを変性させた後、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、35サイクル行った。その後、さらに72℃で10分間反応を行った。【0250】該cDNA断片を制限酵素HindIIIとXbaIで切断後、1.1kbのHindIII-XbaI断片を取得した。また、pBluescript II SK(+)を制限酵素HindIIIとXbaIで切断後、3.0kbのHindIII-XbaI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、pBS-KAT06734Lを造成した。PCR增幅断片にエラーのないことはシーケンスにより確認した。pBS-KAT06734Lを含む大腸菌であるEscherichia coli DH5α/pBS-KAT06734Lは、平成11年12月8日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6967として寄託されている。

##### (2) KAT06734Lポリペプチド発現用プラスミドpAMo-KAT06734Lの造成

上記(1)で造成したpBS-KAT06734Lを制限酵素HindIIIとNotIで切断後、1.1kbのHindIII-NotI断片を取得した。また、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]を制限酵素HindIIIとNotIで切断後、8.7kbのHindIII-NotI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、pAMo-KAT06734Lを造成した。

##### (3) KAT06734Lポリペプチドのヒト培養細胞株における発現

コントロールプラスミド(pAMo)およびKAT06734Lポリペプチド発現用プラスミド(pAMo-KAT06734L)を、それぞれ1μg/μlになるようTEに溶解した後、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]によりNamalwa KJM-1細胞[Cytotechnology, 1, 151 (1988)]に導入し、形質転換細胞を得た。

【0251】1.6×10<sup>6</sup>細胞あたり4μgのプラスミドを導入した後、8mlのRPMI 1640·ITPSG培地[7.5% NaHCO<sub>3</sub>を1/40量、200mmol/L L-グルタミン溶液(GIBCO社製)を3%、ベニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO社製、5000 units/ml ベニシリン、5000μg/ml ストレプトマイシン)を0.5%、10mmol/L N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルフォニック・アシド(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid; HEPES)、

3  $\mu$ g/ml インシュリン、5  $\mu$ g/ml トランスフェリン、5mmol/L ピルビン酸ナトリウム、125nmol/L 亜セレン酸ナトリウム、1mg/ml ガラクトースを添加した RPMI 1640 培地（日本製薬社製）] に懸濁し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで37°Cで24時間培養した。その後、G418（ギブコ社製）を0.5mg/ml になるように添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質換株は、0.5mg/ml のG418を含む RPMI 1640・IT PSG 培地で継代した。

【0252】該安定形質転換株またはその膜画分は、上記(6-1)に記載した方法に準じて、KAT06734Lポリペプチド（新規G蛋白質受容体）のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索にも利用することができる。

実施例3 KAT06734L染色体遺伝子の構造解析  
本発明のKAT06734L cDNAの配列と、データベースに登録されてるヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のKAT06734Lポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子（KAT06734L染色体遺伝子と呼ぶ）を同定し、そのプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を下記の方法により決定した。

【0253】KAT06734L cDNAの塩基配列（配列番号2）とGenBank（インターネット上のNational Center for Biotechnology Information (NCBI) のホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) からアクセスできる）に登録されている配列とを比較した結果、登録番号AC005493、AC005680、AC005174、AC005862、AC005853のヒト染色体DNA配列の一部が、KAT06734L cDNAの塩基配列の一部と一致することが判明した。解析の結果、KAT06734L染色体遺伝子は9個のエクソンと8個のイントロンから構成される非常に大きな遺伝子であることが明らかとなった。AC005493とAC005680の配列はつながり、エクソン1とエクソン2を含んでいた（配列番号1-5で表される塩基配列を有するDNA）。AC005174、AC005862、およびAC005853の配列はつながり、エクソン3～9を含んでいた（配列番号1-6で表される塩基配列を有するDNA）。エクソン1の上流配列（1～5 kb）は、KAT06734L染色体遺伝子のプロモーター領域（転写制御領域を含む）と考えられた。登録番号AC005680の配列は、ヒト染色体7p14-15に位置することから、KAT06734L染色体遺伝子はヒト染色体7p14-15に位置することが判明した。KAT06734L染色体遺伝子の染色体上の位置と構造（プロモーター領域、エクソン領域、イントロン領域）は、本研究によってKAT06734L cDNAの構造が明らかになることにより、初めて特定できたものである。

【0254】エクソン1の上流配列（5 kb）について、配列解析ソフトGENETYX-MAC 10.1のTranscription

Factor Database [Nucleic Acids Research 18, 1749 (1990)、Trends in Biochemical Sciences 16, 455 (1991)、Nucleic Acids Research 20S, 2091 (1992)、Nucleic Acids Research 21S, 3117 (1993)] をもとに作成されたMotif Search Programを用いて、転写因子の結合配列のコンセンサス配列の存在について解析した結果、該配列はプロモーター領域を有する配列であると判断された。

【0255】KAT06734L cDNA、KAT06734 cDNA、およびKAT06734L-3'の塩基配列、ならびにKAT06734L染色体遺伝子を比較した結果、KAT06734 cDNAとKATOIII細胞から3'-RACE法で取得したDNA断片は、スプライシングの異常によって生じたバリエントと考えられた。

実施例4 KAT06734L染色体遺伝子からの転写産物のヒト各種細胞における発現量の検討

KAT06734L染色体遺伝子からの転写産物（KAT06734L転写産物と呼ぶ）の定量は、常法〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕にしたがって半定量的PCR法により行った。

【0256】また、どの細胞でも同程度発現していると考えられる $\beta$ -アクチンの転写産物の定量も同時にを行い、細胞間でのmRNA量の違いや、サンプル間での逆転写酵素によるmRNAから一本鎖cDNAへの変換効率に大差ないことを確認した。

【0257】 $\beta$ -アクチン転写産物の定量は、常法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990)、J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759〕にしたがって定量的PCR法により行った。

(a) 各種細胞および細胞株由来の一本鎖cDNAの合成

ヒト細胞株としては、T細胞株（Jurkat、Molt-3、Molt-4、HUT78）、B細胞株（Namalwa KJM-1、Daudi、Raji）、顆粒球/单球系細胞株（HL-60、U-937、THP-1）、血管内皮細胞株（IVEC、HUVEC）、メラノーマ細胞株（WM266-4、WM115）、神経芽細胞腫細胞株SK-N-MC、肺癌細胞株（PC-9、HLC-1、QG90）、前立腺癌細胞株PC-3、胃癌細胞株KATOIII、膵臓癌細胞株（Capan-1、Capa n-2）、大腸癌細胞株（Colo205、SW1116、LS180）を用いた。Jurkat、QG90およびSW1116は愛知癌センターより入手した。HLC-1は大阪大学癌研究所より入手した。KATOIIIおよびPC-9は免疫生物研究所より入手した。HUVEC (human umbilical vascular endothelial cell) はクラボ社より入手した。IVEC (J. Cell. Physiol., 157, 41 (1993)) はN. T. L. FRANCE社より入手した。Molt-4、DaudiはJapanese Collection of Research Bioresources (JCRB) cell bank [インターネットアドレス <http://cellbank.nihs.go.jp/>] より入手した。それ以外の細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャ

一・コレクション (American Type Culture Collection) より入手した。

【0258】また、健康な成人の末梢血よりPolymorphph rep<sup>TM</sup> (Nycomed Pharma社製) を用いて多形核白血球と单核球を分離取得した。次いで、取得した单核球からNyronFiber (和光純薬社製) を用いてT細胞を取得した。方法はNyron Fiberの説明書に従った。J. Immunol., 150, 1122 (1993)に記載の方法に従って、取得したT細胞を以下の3種の条件で培養し、活性化T細胞を取得した。

①10%FCSを含むRPMI 1640培地を用いて $1 \times 10^6$ 細胞/m<sup>1</sup>でシードしたT細胞に、50ng/m<sup>1</sup>のインターロイキン2 (IL-2) 、1μg/m<sup>1</sup>のphytohemagglutinin-P (PHA-P) 、および5ng/m<sup>1</sup>のトランスフォーミング・グロース・ファクター-β (TGF-β) を添加し、2日間、4日間、6日間、または8日間培養後、細胞を回収した。

②10%FCSを含むRPMI 1640培地を用いて $1 \times 10^6$ 細胞/m<sup>1</sup>でシードしたT細胞に、50ng/m<sup>1</sup>のIL-2と1μg/m<sup>1</sup>のPHA-Pを添加し、4日間、6日間、または8日間培養後、細胞を回収した。

③抗CD3抗体をコートした培養容器に、10%FCSを含むRPMI 1640培地を用いて $1 \times 10^6$ 細胞/m<sup>1</sup>でT細胞をシードし、50ng/m<sup>1</sup>のIL-2の存在下、2日間、4日間、6日間、または8日間培養後、細胞を回収した。

【0259】各細胞の全RNAは常法 [Biochemistry, 18, 5294 (1977)] にしたがって調製した。全RNAから一本鎖cDNAの合成はキット (SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> Preamplication System; BRL社製) を用いて行った。細胞株については5μgの全RNAから一本鎖cDNAを合成し、それぞれ水で50倍希釈してPCRの錆型として使用した。プライマーとしては、オリゴ(dT) プライマーを用いた。

【0260】また、ヒト各種臓器由来のmRNA (Clontech社製) から同様にして一本鎖cDNAを合成した。1μgのmRNAから一本鎖cDNAを合成し、水で240倍希釈してPCRの錆型として使用した。プライマーとしては、オリゴ(dT) プライマーを用いた。mRNAとしては、以下の35種類の臓器由来のmRNAを使用した。1副腎、2脳、3尾状核、4海馬、5黒質、6視床、7腎、8脾臓、9脳下垂体、10小腸、11骨髓、12扁桃体、13小脳、14脳梁、15胎児脳、16胎児腎、17胎児肝臓、18胎児肺、19心臓、20肝臓、21肺、22リンパ節、23乳腺、24胎盤、25前立腺、26唾液腺、27骨格筋、28脊髄、29脾臓、30胃、31精巣、32胸腺、33甲状腺、34気管、35子宮。

(b) 定量的PCR用のスタンダードおよび内部コントロールの調製

pBS-KAT06734LをcDNA部分を切り出す制限酵素HindIIIとNotIで切断して直鎖状DNAに変換した後、酵母のトランスファーRNAを1μg/m<sup>1</sup>で含む水で段階的に希釈して、定量用のスタンダードとして用いた。

【0261】また、β-アクチンをコードするcDNAを含有するpUC119-*ACT*、およびβ-アクチンをコードするcDNAの一部を欠損させたcDNAを含有するpUC119-*ACTd*のそれぞれのcDNA部分を制限酵素HindIIIとAsp718で切断して直鎖状DNAに変換した後、酵母のトランスファーRNAを1μg/m<sup>1</sup>で含む水で段階的に希釈して、それぞれβ-アクチンの転写産物定量用のスタンダードおよび内部コントロールとして用いた [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759]。

(c) PCR法を用いたKAT06734L転写産物の定量 (a) で調製した各種組織および細胞株由来の一本鎖cDNAを錆型としてPCRを行った。PCRには、配列番号9 (図7の0634-5') および配列番号17 (図8の06734-3') で表される塩基配列を有するDNAをプライマーセットとして用いた。また、上記(b) で作製したスタンダードを錆型として同様にPCRを行うことにより検量線を作製した。

【0262】PCR反応は、(a) で合成した一本鎖cDNA (5μl) に、Forwardプライマー (配列番号9に記載のDNA) を10pmol、Reverseプライマー (配列番号17に記載のDNA) を10pmol、2.5mmol/L dNTP混合液を1.6μl、ジメチルスルフォキシドを1μl、5単位/μlのRecombinant Taq DNA Polymerase (Takara社製) を0.1μl、10×反応緩衝液 (Takara社製) を2μl添加し、滅菌水を加えて全量を20μlに調製した。サーマルサイクル-DNA engine (MJ Research社製) を用い、94°Cで3分間の熱処理によりDNAを変性させ後、94°Cで1分間、60°Cで1分間、72°Cで1分間からなる反応を1サイクルとして25~35サイクル行った。該反応液の一部 (8μl) をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルをSYBR Green I nucleic acid stain (Molecular Probes社) で染色した。増幅されたDNA断片のパターンをフルオロイメージャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製) で解析することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。より正確な転写産物の定量を行なうため、PCRのサイクル数を変えて同様のPCRを行った。スタンダードの量はPCRのサイクル数に応じて変化させた。【0263】β-アクチンの転写産物の定量についてはJ. Biol. Chem., 269, 14730 (1994) および特開平06-181759に記載の方法と同様に行った。

【0264】KAT06734L転写産物は、ヒト正常組織では視床と小脳で比較的多く発現していた。全脳、

海馬、黒質、胎児脳、胎児腎、胎児肝臓、心臓、肝臓、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、胸腺、甲状腺、子宮でも発現が見られた(図15)。KAT06734Lポリペプチドは、上記発現組織において重要な生理学的機能を果たしていると推定される。

【0265】ヒト培養細胞株では、大腸癌細胞株(LS-180、Colo205)および胃癌細胞株(KATOIII)でKAT06734L転写産物の発現がみられた。その他の細胞株では発現はみられなかった(図16)。KAT06734L転写産物が発現している上記細胞株は、上記(6-1)に記載した方法に準じてKAT06734Lポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索に利用することができる。

【0266】

【配列表フリーテキスト】

配列番号3-人工配列の説明:合成DNA

SEQUENCE LISTING

<110>; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120>; Novel Polypeptides

<130>; H11-1931A4

<140>;

<141>;

<160>; 18

<170>; PatentIn Ver. 2.0

<210>; 1

<211>; 371

<212>; PRT

<213>; Homo sapiens

<400>; 1

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly

1 5 10 15

Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe

20 25 30

Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe

35 40 45

Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile

50 55 60

Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys

65 70 75 80

Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe

85 90 95

Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly

100 105 110

Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln

115 120 125

Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile

130 135 140

Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu

配列番号4-人工配列の説明:合成DNA

配列番号5-人工配列の説明:合成DNA

配列番号6-人工配列の説明:合成DNA

配列番号7-人工配列の説明:合成DNA

配列番号8-人工配列の説明:合成DNA

配列番号9-人工配列の説明:合成DNA

配列番号10-人工配列の説明:合成DNA

配列番号11-人工配列の説明:合成DNA

配列番号12-人工配列の説明:合成DNA

配列番号13-人工配列の説明:合成DNA

配列番号14-人工配列の説明:合成DNA

配列番号17-人工配列の説明:合成DNA

配列番号18-人工配列の説明:合成DNA

【0267】

【配列表】

る。

【図11】 KAT0673-3'の塩基配列と該配列から予想されるアミノ酸配列を示した図である。図8で示したイントロン3の位置を図中に示してある。

【図12】 図11と同様の図であり、図11の統葉である。

【図13】 図11と同様の図であり、図12の統葉である。

【図14】 KAT06734Lポリペプチドと既知G PCRのアミノ酸配列を用いて作成したデンドログラムを示した図である。既知G PCRとしては、ヒトバソプレッシン1A受容体、マウスバソプレッシン1A受容体、ヒトバソプレッシン1B受容体、ヒトバソプレッシン2受容体、ヒトオキシトシン受容体、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、ホワイトサッカーバソトシン受容体を用いた。デンドログラムは、CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program (<ftp://ftp-igbm.c.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) を用いて作成した。

【図15】 PCR法を用いて、35種のヒト臓器におけるKAT06734L転写産物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は35である。矢印は目的の增幅断片(318 bp)の位置を示している。電気泳動図の各レーンのサンプルは以下の通りである。

n.c. : ネガティブコントロール、1 : Adrenal Gland (副腎)、2 : Brain (脳)、3 : Brain, caudate nucleus (脳、尾状核)、4 : Brain, hippocampus (脳、海馬)、5 : Brain, substantia nigra (脳、黒質)、6 : Brain, thalamus (脳、視床)、7 : Kidney (腎臓)、8 : Pancreas (脾臓)、9 : Pituitary gland (脳下垂体)、10 : Small intestine (小腸)、11 : Bone marrow (骨髓)、12 : Brain, amygdala (脳、扁桃体)、13 : Brain, cerebellum (脳、小脳)、14 : Brain, corpus callosum (脳、脳梁)、15 : Fetal brain (胎児脳)、16 : Fetal kidney (胎児腎臓)、17 : Fetal liver (胎児肝臓)、18 : Fetal lung (胎児肺)、19 : Heart (心臓)、20 : Liver (肝臓)、21 : Lung

(肺)、22 : Lymph node (リンパ節)、23 : Mammary gland (乳腺)、24 : Placenta (胎盤)、25 : Prostate (前立腺)、26 : Salivary gland (唾液腺)、27 : Skeletal muscle (骨格筋)、28 : Spinal cord (脊髄)、29 : Spleen (脾臓)、30 : Stomach (胃)、31 : Testis (精巣)、32 : Thymus (胸腺)、33 : Thyroid (甲状腺)、34 : Trachea (気管)、35 : Uterus (子宮)、36 : Standard 0.01 fg (標準試料 0.01 fg)、37 : Standard 0.1 fg、38 : Standard 1 fg、M. : サイズマーカー

【図16】 PCR法を用いて、各種ヒト細胞株、末梢T細胞、および活性化末梢T細胞におけるKAT06734L転写産物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は25である。矢印は目的の增幅断片(318 bp)の位置を示している。電気泳動図の各レーンのサンプルは以下の通りである。

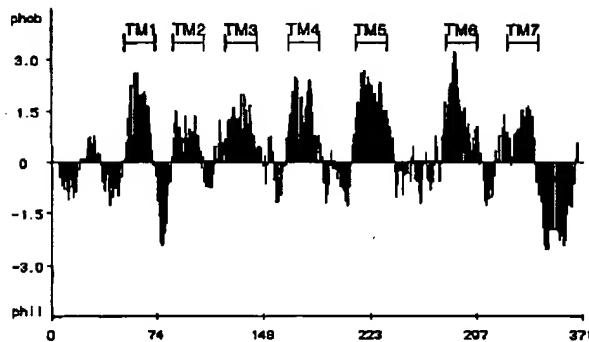
n.c. : ネガティブコントロール、1 : Jurkat、2 : Molt-3、3 : Molt-4、4 : Hut78、5 : Namalwa KJM-1、6 : Daudi、7 : Raji、8 : HL-60、9 : U937、10 : THP-1、11 : IVEC、12 : HUVEC、13 : WM266-4、14 : WM115、15 : SK-N-MC、16 : PC-9、17 : HLC-1、18 : QG-90、19 : PC-3、20 : KATO-III、21 : Capan-1、22 : Capan-2、23 : Colo205、24 : SW1116、25 : LS180、26 : T cell (無刺激)、27 : T cell IL-2 (インターロイキン-2) + PHA (Phytohemagglutinin) + TGF- $\beta$  (トランスフォーミング・グロース・ファクター- $\beta$ ) 2日間(2日間培養)、28 : T cell IL-2+PHA+TGF- $\beta$  4日間、29 : T cell IL-2+PHA+TGF- $\beta$  6日間、30 : T cell IL-2+PHA+TGF- $\beta$  8日間、31 : T cell IL-2+PHA 4日間、32 : T cell IL-2+PHA 6日間、33 : T cell IL-2+PHA 8日間、34 : T cell IL-2+抗CD3抗体 2日間、35 : T cell IL-2+抗CD3抗体 4日間、36 : T cell IL-2+抗CD3抗体 6日間、37 : T cell IL-2+抗CD3抗体 8日間、38 : Standard 1 fg (標準試料 1 fg)、39 : Standard 10 fg、40 : Standard 50 fg、41 : Standard 125 fg、M. : サイズマーカー

### 【図6】

V1aR	-----	
V1aR-MOUSE	-----	
vasotocin	CIPLDCSRKSSQCIPLDCSRKSSQCMSKES-----	434
OXTR	-----	
V1bR	-----	
V2R	-----	
KAT06734	-----	
GnRHR	-----	

【図1】

## Hydropathy for KAT06734L

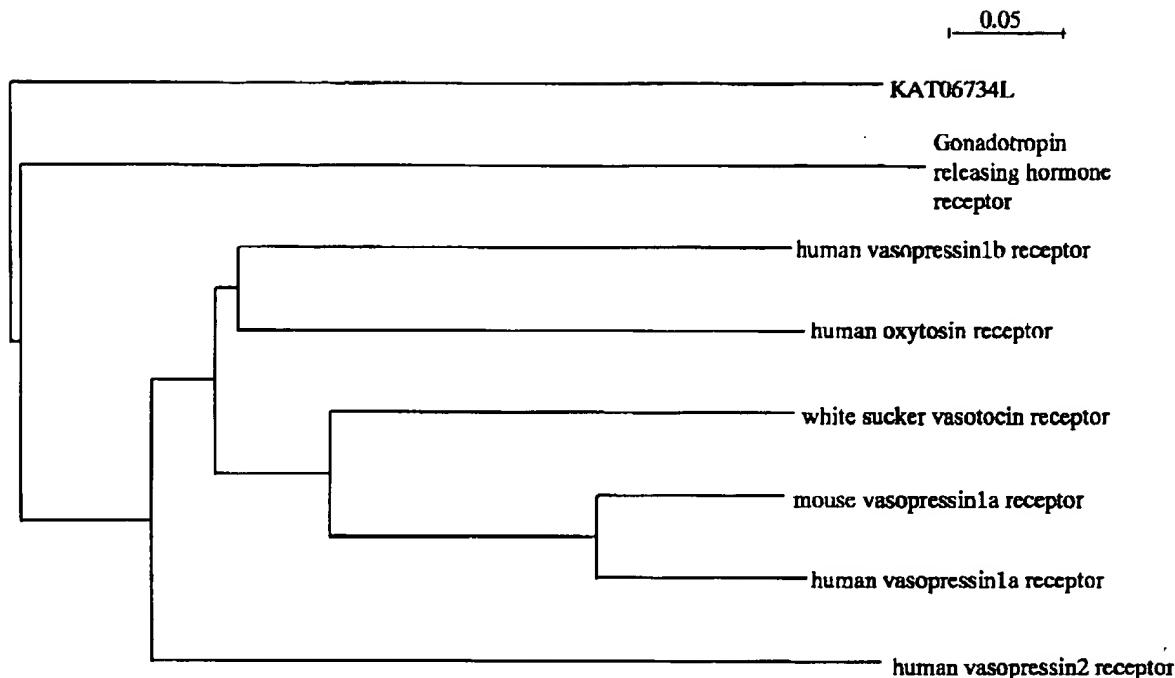


## 【図2】

V1aR	-----MR-LSAGPDAGESGNSPWWPLATGAGNTSREAEALGEGNNGPPRDV-----	45
V1aR- MOUSE	-----MS-FPPRGSHDLPGAGNSPWWPLTTEGANS SREAAGLGEGGSPPGDV-----	45
vasotocin	-----MGRIANQT-----TASNDTDPFG-----	18
OXTR	-----MEGALAANWSAEEANASAAPP-----GAEGNRTAGPPR-----	33
V1bR	-----MD-----SGELWDANPTPRG-----TISAPNATTWPLG-----	28
V2R	-----MLMASTTSAVPGHPSLPSLPSNSQERPLDT-----	31
GnRHR	-----MANSASEEQNQHCS-----AINNSIPLMQGNLP-----	29
KAT06734L	-----MPANFTEGSFDSSTGTQTLDDSSPVACTETVTFTEVVEGKEWGS-----	43

V1aR	RNEELAKLIEIAVLAVTFAVAVLGNSSVLLAHRTPRK-----	TSRMHLFIRHLSLADLA	99
V1aR- MOUSE	RNEELAKLEVTVLAVIFVVAVLGNSSVLLAHRTPRK-----	TSRMHLFIRHLSLADLA	99
vasotocin	RNEEVAKMIEITVLSVTFFVAVIGNLSVLLAMHNTKKK-----	SSRMHLFIKHLSSLADMV	72
OXTR	RNEALARVEVAVLCLLILLALSGNACVLLARLTTRQK-----	HSRLEFFFMKHLSIADLV	87
V1bR	RDEELAKVEIGVLATVVLATGGNLAVLLTGLQLGRK-----	RSRMHLFVFLHLALTDLA	82
V2R	RDPLLARAELALLSIVFVAVALSNGLVLAAALARRGRGH-----	WAP1HFVIGHLCLADLA	87
GnRHR	TLTLSGKIRVTVTFFILLLSATFNASFLLKQWTQKKEGKQLSRMKLKKHLTLANL		89
KAT06734L	FYYSFKTEQLTLWVLFVТИGNSVVLFSTWRRKKK-----	SRMTFFVTLQALITDSF	96
	.. : * . : * . : ..	.. : * . : ..	
	TM1	TM2	

【図14】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.7	識別記号	F I	テ-クニ-ド' (参考)
A 6 1 K	45/00	1 0 1	A 6 1 P 25/00 4 B 0 6 5
A 6 1 P	25/00		35/00 4 C 0 8 4
	35/00		
C 0 7 K	14/705	C 0 7 K 14/705 4 C 0 8 5	16/28 4 H 0 4 5
	16/28		
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N 1/15	1/19
	1/19		1/21
	1/21	C 1 2 P 21/02	C
	5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P	21/02		Z
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N 33/15	Z
		33/50	Z
G 0 1 N	33/15	33/53	D
	33/50		M
	33/53	33/566	
	33/566	C 1 2 P 21/08	
		(C 1 2 P 21/02	C

// C12P 21/08  
 (C12P 21/02  
 C12R 1:91)

C12R 1:91)  
 C12N 15/00  
 5/00

ZNAA  
 A

(72)発明者 河合 宏紀  
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸  
 酿工業株式会社東京研究所内  
 (72)発明者 西 達也  
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸  
 酒工業株式会社東京研究所内  
 (72)発明者 中村 祐輔  
 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1-17-33  
 (72)発明者 菅野 純夫  
 東京都杉並区南荻窪4-8-13

Fターム(参考) 2B030 AB04 AD08 CA06 CA17 CA19  
 CB03  
 2G045 AA26 AA34 AA35 AA40 BB20  
 CB01 CB17 CB20 CB21 DA12  
 DA13 DA14 DA36  
 4B024 AA11 AA12 BA53 BA63 CA04  
 CA12 DA01 DA02 DA05 DA11  
 EA04 GA03 GA14 HA01 HA12  
 HA15  
 4B063 QA01 QA05 QA12 QA19 QQ08  
 QQ21 QQ33 QQ61 QQ62 QQ73  
 QQ79 QQ89 QQ91 QQ94 QR32  
 QR42 QR50 QR62 QR75 QR76  
 QR77 QR78 QR80 QS03 QS05  
 QS24 QS25 QS34 QX07  
 4B064 AG01 AG26 AG27 BA14 CA02  
 CA05 CA10 CA11 CA19 CA20  
 CC24 DA01 DA13 DA14  
 4B065 AA15X AA22X AA24X AA26X  
 AA32X AA41X AA48X AA72X  
 AA79X AA87X AA88X AA90X  
 AA92X AA93X AA93Y AB01  
 AB05 AC14 BA02 BA03 CA24  
 CA25 CA44 CA46  
 4C084 AA17 ZA022 ZB262  
 4C085 AA13 AA14 BB50 CC03  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
 CA40 DA50 EA20 EA50 EA51  
 FA72 FA73 FA74 HA05